

УДК 571.27: 595.143

## РОЛЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ИММУНИТЕТЕ ПАЗАРИТИЧЕСКИХ ПИЯВОК (ANNELIDA, HIRUDINEA)

© 2021 г. И. А. Кайгородова\*

Лимнологический институт СО РАН,  
ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033 Россия  
\* e-mail: [irina@lin.irk.ru](mailto:irina@lin.irk.ru)

Поступила в редакцию 20.08.2020 г.

После доработки 21.10.2020 г.

Принята к печати 25.10.2020 г.

В обзоре кратко изложено современное состояние знаний об иммунитете пиявок с особым акцентом на роль антимикробных пептидов (АМП), подчеркивается широкое разнообразие первичных структур АМП, которые, по-видимому, коррелируют с разнообразием жизненных стратегий и экологией эктопаразитов. Антимикробные белки и пептиды представляют собой разнообразный класс природных молекул, которые вырабатываются всеми живыми организмами в ответ на атаку патогена и которые являются важнейшим компонентом иммунной системы. АМП могут обладать широким спектром антибиотической активности против чужеродных и потенциально патогенных бактерий, грибов и вирусов. Не последнюю роль АМП играют при отборе колонизирующих бактериальных симбионтов, что помогает многоклеточным организмам справляться с определенными экологическими проблемами. Особенно важны АМП для беспозвоночных ввиду отсутствия у них системы адаптивного иммунитета. Хотя многие АМП обладают сходными физико-химическими свойствами (общий размер от 10 до 100 аминокислот, суммарный положительный заряд или высокое содержание цистеинов), их иммуномодулирующая активность специфична для каждого такого пептида.

**Ключевые слова:** паразитирующие пиявки, иммунитет, антимикробные пептиды

**DOI:** 10.31857/S0031184721010026

Пиявки (Hirudinea) относятся к классу кольчатых червей (Clitellata, Annelida), для половозрелых особей которых характерен поясок, особый орган, вырабатывающий репродуктивный кокон. В настоящее время известно более 720 видов пиявок, которые распространены в пресных, морских и наземных экосистемах по всему миру, и более двух третей этого биоразнообразия составляют паразитические виды (Sket, Trontelj, 2008; Kaygorodova et al., 2020). Пиявки возникли порядка 540 млн лет назад во время кембрийского взрыва, в период бурного биологического развития (Pfeiffer et al., 2005; Kaygorodova, Sherbakov, 2006; McDougall et al., 2008). Считается, что ближайшим предком паразитических пиявок являются олигохеты. Первые пиявоподобные черви (Acanthobdellida) мозаично сочетают в своем строении примитивные признаки олигохет

семейства Lumbriculidae с признаками, присущими современным пиявкам (Ливанов, 1905; Kaygorodova, 2012; Kaygorodova et al., 2012). Филогенетические исследования показывают, что общим предком истинных пиявок (Euhirudinea), вероятно, была кровососущая пиявка с хоботком (Arhynchobdellida), а не специфический эктокомменсал, как предполагали ранее (Trontelj et al., 1999). В ходе эволюции у хищных аринхобделлидных предков пиявок могла произойти редукция хоботка, что позволило им проглатывать более крупную добычу. Вторичная приспособленность к кровососанию у бесхоботных пиявок отряда Hirudiniformes могла возникнуть благодаря преадаптации к эктопаразитарному питанию кровью. Кроме того, транскриптомный анализ выявил высокую гомологию генетических последовательностей челюстной (бесхоботной) пиявки *Hirudo medicinalis* и млекопитающих (Macagno et al., 2010), что может свидетельствовать о коэволюции в системе «хозяин–паразит» посредством молекулярной мимикрии паразита (Salzet et al., 2000).

В ходе эволюции пиявки выработали разные стратегии иммунной защиты, однако, как и другие беспозвоночные, они не обладают системой приобретенного иммунитета с системой диверсификации антител. Защищаясь от микробов, живущих в воде или почве и попадающих в организм с пищей или при травме, пиявки используют систему врожденного иммунитета в качестве основной защиты от потенциальных патогенов (Dhainaut, Scaps, 2001). Особая роль в их иммунном ответе принадлежит антимикробным пептидам (АМП), эволюционно консервативной группе защитных полипептидов (Ageitos et al., 2017).

Первым зарегистрированным АМП был лизоцим, открытый Александром Флемингом в 1922 г. Интерес к лизоциму угас после открытия пенициллина и начала «золотого века антибиотиков». Однако уже в 1960-х появление и рост микробных патогенов, устойчивых к антибиотикам, пробудил новую волну интереса к АМП. С тех пор АМП были выявлены практически во всех живых организмах, от архей до млекопитающих. В настоящее время в базе данных по антимикробным пептидам хранится более 3000 АМП (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), и этот список далеко неполный.

Благодаря древнему происхождению и широкому распространению в природе, АМП остаются ключевым компонентом иммунной системы. Известно, что АМП обладают широким спектром действия против патогенных бактерий, грибов и вирусов, обладающих оболочкой, а также губительны для паразитов и раковых клеток (de Eguileor et al., 2003). Кроме того, АМП принимают участие в регуляции качества и количества мутуалистических и комменсальных симбионтов, тем самым способствуя симбиостазу путем контроля, формирования состава и при необходимости ограничения активности симбиотической микрофлоры в определенных анатомических компартментах (кишечник, бактериомы, кожа) (Tasiemski et al., 2015). Как известно, симбионты представляют собой быстрый источник инноваций, что позволяет животным приспосабливаться к изменяющейся среде обитания (Maske et al., 2017), следовательно, АМП могут косвенно участвовать в способности пиявок справляться с изменениями окружающей среды.

Использование пиявки в качестве модельного организма в иммунологических исследованиях имеет свои преимущества. Являясь водным эктопаразитом, пиявка своим покровным эпителием вынужденно контактирует не только с множеством микроорганизмов окружающей ее среды, но и с внешними покровами хозяина, имеющими свой состав эктосимбионтов и защитных молекул. В период питания, что случается редко, пиявки максимально используют предоставленную возможность, потребляя вдвое больше собственного веса (Sawyer, 1986). При этом пища переваривается чрезвычай-

но медленно, и кровь хозяина сохраняется в кишечнике паразита длительное время (до нескольких месяцев у медицинских пиявок). Должно быть, в пищеварительной системе пиявок имеется защитный механизм, адаптированный к патогенам хозяина и предотвращающий гнилостные процессы. Не менее важным свойством пиявок является их способность к регенерации центральной нервной системы и восстановлению ее функций после травмы (Burrell et al., 2003). Анатомические особенности пиявки облегчают использование нервного тяжа пиявки *in vitro*. Нервный тяж довольно легко поддерживать в культуре в течение нескольких недель в отсутствие компонентов периферической иммунной системы и клеток крови, что позволяет сфокусировать исследования на собственном иммунном ответе, развиваемом нервной системой пиявки (Schikorski et al., 2008). Более того, как показали клинические исследования, использование пиявок в лечебных целях не вызывает иммунных реакций со стороны пациента (Singh, 2010).

В обзоре рассматриваются особенности иммунной системы пиявок с акцентом на роль в ней антимикробных пептидов (АМП), подчеркивается разнообразие первичных структур АМП, фокусируется внимание на их функциональных особенностях и механизмах действия, а также на перспективах практического применения АМП не только в медицине, но и в других отраслях человеческой деятельности.

### **Иммунная система пиявок**

Пиявки, как и другие беспозвоночные животные, обладают системой врожденного иммунитета, в их иммунном ответе отсутствует адаптивный (приобретенный) компонент, появившийся на более поздних этапах эволюции у позвоночных (Hoffmann et al., 1999). Врожденный иммунитет играет важную роль в качестве первого барьера от микробов. Эффекторы врожденного ответа включают рецепторы распознавания образов, фагоцитарные клетки, протеолитические каскады и полипептиды с антимикробными свойствами. Несмотря на общность врожденной защиты, исследования генома показали, что даже представители одного и того же отряда беспозвоночных используют разные подходы к внутренней защите (Loker et al., 2004). Особенность пиявок состоит в том, что они имеют тесные ассоциации как с симбионтами, которые могут играть важную роль во внутренней защите, так и вынужденные контакты с хозяевами, на которых они паразитируют. Примером может служить медицинская пиявка *Hirudo verbana*, пищеварительный тракт которой необычен в двух аспектах: содержит простое микробное сообщество и хранит большое количество крови позвоночных в течение нескольких месяцев (Silver, Graf, 2011).

В ходе длительной эволюции пиявки выработали несколько стратегий иммунной защиты от микробов, с которыми они контактируют в воде или почве, а также защитные механизмы от патогенов, что попадают в организм с пищей или после травмы (Salzet et al., 2006). При этом пиявки относятся к группе примитивных вторичнополостных или целомических животных и анатомически характеризуются наличием двух компартов, содержащих свободные клетки. Во-первых, это система крови с гемоцитами: этот компармент, по-видимому, активно не связан с иммунитетом; и, во-вторых, целом, в котором содержится несколько популяций целомоцитов, играющих определенную роль в иммунной защите. Пиявки обладают специально развитым клеточным иммунитетом, направленным против патогенных микроорганизмов, включая фагоцитоз, инкапсуляцию и спонтанную цитотоксичность целомоцитов в отношении аллогенных или ксеногенных клеток. Дополнительно они выработали важный гуморальный

иммунитет, который основан на антимикробных, гемолитических и свертывающих свойствах жидкости их организма.

### Клеточный иммунный ответ

Все аннелиды, включая пиявок, имеют эффекторные клетки (целоциты), которые обладают спонтанной аллогенной и ксеногенной цитотоксичностью (Suzuki, Cooper, 1995). При контакте целоцитов с клеткой-мишенью неотвратимо происходит лизис последней (Cossarizza et al., 1995) по аналогии с цитотоксической активностью естественных клеток-киллеров (ЕК) у позвоночных. Как и в системе ЕК, специфичность мишени чрезвычайно широка, поскольку ксеногенные, аллогенные и даже сингенные эритроциты погибают при соответствующих условиях. Специфичность этих цитотоксических эффекторов может быть направлена на гликопротеины клеточной поверхности на поверхности клеток-мишеней, поскольку несколько определенных моно- и дисахаридов могут блокировать уничтожение. При совместном культивировании целоцитов с ЕК-чувствительными клеточными линиями мелкие целоциты (МЦ) становятся возбужденными, распространяя многочисленные псевдоподии, которые связываются с клетками-мишенями и убивают их, тогда как крупные целоциты (КЦ) агрегируют вокруг лизированных мишеней и инкапсулируют их до образования гранулем (Quaglino et al., 1996). МЦ активны во время распознавания, быстро связываются с мишенями, а КЦ являются фагоцитирующими. Одна группа клеток МЦ производит распознавание, связывание и уничтожение, тогда как функцию очистки оставшегося мусора выполняет другая группа клеток типа КЦ. Эти результаты показывают, что фагоцитоз и цитотоксичность опосредованы двумя разными типами клеток; лейкоциты кольчатых червей полифункциональны и не являются исключительно фагоцитирующими (Cooper et al., 2001), что свидетельствует о ранней дивергенции фагоцитоза и лизиса.

При исследовании миграционного поведения клеток, участвующих в воспалительных реакциях, у пиявок *Glossiphonia complanata* выявлено два разных типа клеток: ЕК-подобные клетки и клетки CD8<sup>+</sup> (de Eguileor et al., 2000). Как и у других кольчатых червей, лейкоциты пиявки фагоцитируют и инкапсулируют инородный материал избирательно в зависимости от размера (de Eguileor et al., 2003). Инкапсуляция становится визуально заметна, когда паразит полностью покрыт и изолирован толстой меланотической капсулой. При травмировании пиявок в ране наблюдается массовая пролиферация лимфоцитоподобных клеток, происходящих из одного кластера (лейкопоз), как и у позвоночных животных.

### Гуморальный иммунный ответ

Защитные механизмы беспозвоночных, помимо клеточного иммунитета, состоят из лизиса и агглютинации, усиленных воздействием компонентов из целомической жидкости, таких как антигенсвязывающий белок, цитокины и антимикробные вещества (Prochazkova et al., 2020). В конце XX в. было экспериментально доказано наличие комплементоподобной активности у аннелид (Cooper et al., 1995), а вскоре был выделен и **целомный цитолитический фактор** (ЦЦФ), который имеет функциональную аналогию с фактором некроза опухоли (ФНО) позвоночных (Beschlin et al., 1999). В отличие от ФНО, цитолитическая активность ЦЦФ опосредуется лизисом и не связана с протеолизом.

Помимо ЦЦФ, в целоме кольчатых червей присутствуют **порообразующие белки**, такие как эзенипор, лизенин и фетидин. Эти молекулы связываются и нарушают

липидный бислой только в тех случаях, когда присутствуют сфинголипиды (Milochau et al., 1997). Посредством канального комплекса компоненты иммунной системы аннелид разрушают чужеродные компоненты. Кроме того, перфорин-подобные белки (Kauschke et al., 1997) создают дыры в мембранах клеток-мишеней, способствуя проникновению литических молекул, таких как лизенины, лизины, фетидины и гемолизины.

**Цитокины** представляют собой небольшие молекулы белка (5–20 кДа), которые играют решающую роль в борьбе с инфекциями и другими иммунными реакциями (Dinarello, 2000), участвуя в аутокринной, паракринной и эндокринной передаче сигналов в качестве иммуномодулирующих агентов.

Что касается **митогенных факторов**, в целомической жидкости аннелид был идентифицирован компонент с массой 60 кДа, обладающий митогенной активностью в отношении спленоцитов мыши и названный ЦМФ (целомный митогенный фактор) (Hanusova et al., 1999). В этой же работе было показано, что целомическая жидкость аннелид, обогащенная ЦМФ, проявляет фосфолипазную активность, и PLA2-подобный фермент участвует в иммунных реакциях, таких как антибактериальные механизмы.

**Антигенсвязывающие белки** у аннелид состоит из двух дисульфидсвязанных полипептидных цепей (31 и 33 кДа), обе участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта (Tučkova et al., 1991).

**Ингибиторы протеаз.** У птичьей пиявки *T. tessulatum* был найден генный тандем цистатин В (Tt-cysb) и катепсин L (Tt-catl) (Lefebvre et al., 2004). Tt-cysb принадлежит к семейству ингибиторов цистеиновой протеазы. Его последовательность демонстрирует 54 % идентичность с цистатином В человека. Tt-cysb экспрессируется только в одной популяции циркулирующих целомических клеток. Бактериальное заражение приводит к усилению транскрипта Tt-cysb исключительно в этих клетках.

**Антимикробные белки.** Наиболее изученным антимикробным белком у аннелид является лизоцим (Perin, Jolles, 1972). Этот фермент расщепляет связи  $\beta$ -1-4 между N-ацетилглюкозаминном и N-ацетилмураминовой кислотой грамположительных бактериальных клеточных стенок. Помимо лизоцимной активности, целомическая жидкость *E. fetida andrei* проявляет антибактериальную, гемолитическую и гемагглютинирующую активность. Эти действия в основном опосредованы двумя белками, называемыми фетидинами (Lassegues et al., 1997).

У пиявок обнаружена собственная лизоцимоподобная активность для дестабилазы, несколько изоформ которой составляют семейство белков, характеризующееся активностью лизоцима (Baskova et al., 2001). Кроме того, в жировых клетках пиявок был обнаружен белок, обладающий бактериостатической активностью, принадлежащий к семейству гемэритринов (Salzet et al., 2006).

Антимикробные пептиды (АМП) в отличие от белков имеют меньшую длину полипептидной цепи (менее 100 аминокислотных остатков) и единую для всех цистеин-стабилизированных АМП структурную сигнатуру в виде  $\gamma$ -мотива (Yeaman, Yount, 2007). Для всех АМП характерны такие физико-химические свойства, как амфипатичность и катионный характер, обеспечивающие их биологические функции, а именно: естественную антибактериальную активность, хемотаксис иммунных клеток, иммуномодуляцию, нейтрализацию эндотоксинов, участие в регенерации нервной системы (Salzet et al., 2006). АМП пиявок были выделены из четырех гематофаговых видов: трех медицинских пиявок *Hirudo medicinalis*, *H. verbena* и *H. nipponica*, питающихся кровью преимущественно теплокровных животных, и пиявка *Theromyzon tessulatum*, паразитирующая на водоплавающих птицах. Первым аннелидным АМП был люм-

брицин, полученный из *Lumbricus rubellus* (Cho et al., 1998). Позже сходный АМП был выявлен у пиявок (Schikorski et al., 2008). В настоящее время имеются сведения о шести АМП, обнаруженных у пиявок: теромацин, теромизин, пептид В (Tasiemski et al., 2004), нейромацин, люмбрицин (Schikorski et al., 2008) и гирудомацин (Ding et al., 2019).

### **Роль АМП в иммунном ответе**

Как было показано выше, АМП являются частью врожденного иммунного ответа и играют важную роль в первой линии защиты от микроорганизмов, локализуясь, в основном, в эпителиальных тканях внешних покровов и кишечника. Пептиды могут быть индуцибельными или конститутивными, они неспецифичны и реагируют до того, как приобретенный иммунный ответ был инициирован, они не генерируют иммунную память, они не являются каталитическими, но обеспечивают экономию клеток, будучи мелкими эффекторными молекулами (Wiesner, Vilcinskas, 2010).

В дополнение к их прямой антимикробной активности, некоторые АМП обладают различными иммуномодулирующими функциями (Afacan et al., 2012).

Вот некоторые из наиболее важных из них:

1) Хемотаксическая активность: АМП действуют прямо как хемоаттрактант, способный привлекать иммунные клетки к месту инфекции. Косвенным образом АМП индуцируют экспрессию широкого спектра хемокинов (Mookherjee, Hancock, 2007).

2) Антиэндотоксиновая активность: АМП обладают способностью подавлять выработку индуцируемых эндотоксином провоспалительных медиаторов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ), путем блокирования или модуляции сигнальных путей толл-подобного рецептора (Bowdish, Hancock, 2005).

3) Дифференцировка иммунных клеток: АМП, по-видимому, напрямую индуцируют процессы дифференцировки и активации клеток, соединяя воедино элементы врожденного и приобретенного иммунитета (Davidson et al., 2004).

4) Заживление ран и ангиогенез: заживление ран включает повторный рост эпителиальных слоев и образование новых кровеносных сосудов (ангиогенез). АМП действуют непосредственно на эпителиальные и эндотелиальные клетки, вызывая реэпителизацию и ангиогенез. АМП также косвенно индуцируют заживление ран благодаря своим хемотаксическим эффектам (Wu et al., 2010).

Благодаря этим иммуномодулирующим и антибактериальным свойствам, АМП являются отличными кандидатами для лечения инфекций, так как они могут контролировать воспаление в месте заражения.

### **Разнообразие антимикробных пептидов.**

#### **Структура и свойства АМП пиявок**

Открытие первых АМП в начале 1980-х годов было многообещающим для разработки новых антибиотиков (Hultmark et al., 1983) и решения проблем, связанных с множественной лекарственной устойчивостью патогенных бактерий (Afacan et al., 2012). С тех пор выяснилось, что в живой природе АМП встречаются повсеместно, от примитивных организмов до млекопитающих. Как оказалось, многие АМП филогенетически близки, что предположительно указывает на их эволюционную консервативность (Pasupuleti et al., 2012). Большинство известных АМП имеют низкую молекулярную массу (2–50 кДа). Основные характеристики АМП основаны на том, что

они представляют собой (1) молекулы суммарного положительного заряда (обычно от +2 до +9) из-за большого количества положительно заряженных аминокислот, таких как лизин и аргинин, (2) амфипатические молекулы, стабильные как в водных, так и гидрофобных растворах (Zasloff, 2002).

У АМП выявлено 4 типа вторичных структур: (1)  $\alpha$ -спираль, (2)  $\beta$ -складчатый лист (3) смесь  $\beta$ -листов и  $\alpha$ -спиралей и (4) линейная или случайная структура (Zhang et al., 2014). Однако большинство АМП, находясь в растворе в свободной форме не проявляют особой структуры и принимают окончательную конформацию при взаимодействии с мембраной.

АМП синтезируются в основном в поверхностных тканях, таких как эпителий кожи или кишечника, легкие или эритроциты. Эти пептиды синтезируются в 100 раз быстрее, чем иммуноглобулин, и при низких метаболических затратах, а также могут в качестве резерва накапливаться в клетках и высвобождаться, когда клетки стимулируются при контакте с патогенами (Nissen-Meyer, Nes, 1997). Таким образом, АМП являются быстрым неспецифическим способом борьбы с широким спектром микроорганизмов.

По данным международной базы антимикробных пептидов (APD) за последние 30 лет из разных источников было выделено более 3250 антимикробных пептидов (данные на 02 октября 2020 г.).

Одноклеточные производят АМП в качестве стратегии регуляции численности собственной популяции, а также для борьбы с другими микроорганизмами, конкурирующими с ними за пространство и пищевые ресурсы среды. В настоящее время известно 391 АМП, из них основную массу составляют бактериоцины (бактериальные АМП), из архей выделено 5 АМП, из протист – 8 и 20 АМП получены из грибов (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Механизм их действия разнообразен и включает порообразование, нуклеазную и пептидогликаназную активность, интерференцию с энергетическими процессами и ингибированием синтеза белка и репликации ДНК. Грамотрицательными бактериями продуцируются колицины (25–80 кДа) и микроцины (<10 кДа). К бактериоцинам, продуцируемым грамположительными бактериями, относятся линейные и глобулярные лантибиотики (<5 кДа), пептиды без лантионина (<10 кДа) и высокомолекулярные пептиды (> 30 кДа).

Растения вырабатывают небольшие богатые цистеином АМП (360 АМП по данным APD), которые выявлены во всех органах, но большее их количество накапливается в наружном слое (Nawrot et al., 2014). Большинство растительных АМП имеют молекулярную массу от 2 до 10 кДа. К ним относятся тионины, дефенсины, циклотиды, ноттиноподобные АМП, а также  $\beta$ -барилины, активные только против грибов. Тионины, дефенсины и циклотиды, как было показано, обладает противоопухолевой активностью.

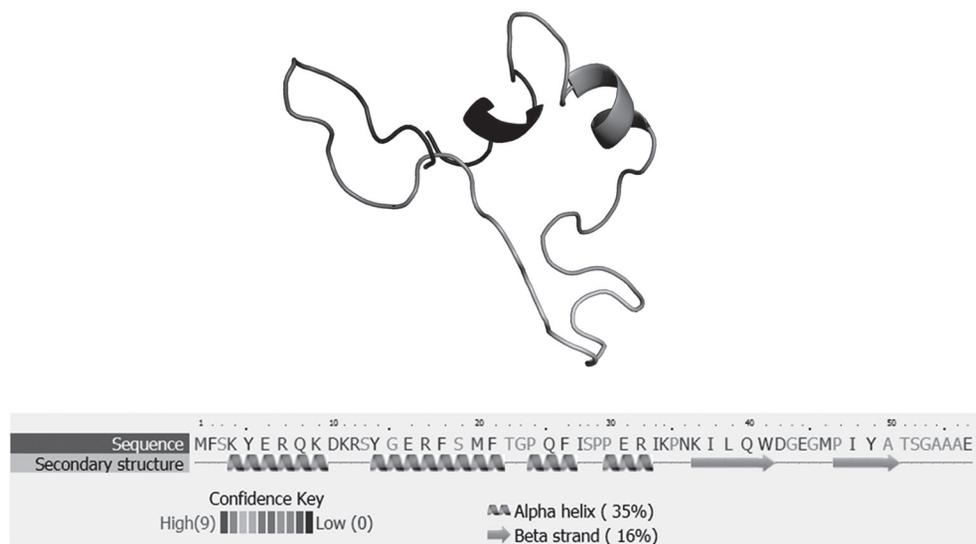
Животные являются наиболее важными и перспективными продуцентами АМП (2396 против 360 из растений или 358 из бактерий).

У насекомых конститутивные АМП накапливаются в клетках крови и слюнных железах, и в присутствии микробов секретируются в гемолимфу. Индуцированные АМП синтезируются после микробной инфекции (Bulet, Stöcklin, 2005). В настоящее время известно большое количество разнообразных по структуре и действию АМП, продуцируемых насекомыми (например: цекропины направлены против грамотрицательных бактерий, грибов, вирусов, а также обладают инсектицидным и противоопухолевым действием; дефенсины активны против грамположительных бактерий; дрозомидин обладает мощной противогрибковой активностью; танатин проявляет антимикробную

активность в отношении устойчивых к множеству лекарственных средств клинических изолятов *E. aerogenes* и *K. pneumoniae*; апидаецин действует против грамотрицательных бактерий; мечниковеин – против грамположительных бактерий, грибов и насекомых; инсектицидная активность выявлена у аттацина и саркотоксина) и огромное разнообразие других АМП.

У водных беспозвоночных обнаружено большое разнообразие пептидов, обладающих в основном антибактериальной и противогрибковой активностью (Ponnaparran et al., 2015). Пептиды, полученные из морских организмов, способны выдерживать высокие концентрации соли, поэтому они могут иметь высокую вероятность успеха при физиологических концентрациях соли. К ним относятся АМП морских губок (дискодермины, галицилиндрамыды, теонелламыды, циклолитизиды и фориоспонгины), медуз, кораллов и других кишечнополостных (аурелины, гидрализины, стиолизины), моллюсков, включая головоногих (митилус, митилин и мицицины), ракообразных (пенаэдины, каллинектины, астацидины, тахиплезин и тахистатины), морских звезд (стронгиолоцины) и кольчатых червей (гедистин, перинерин, ареницин, мацины).

На сегодняшний день в международных базах зарегистрировано порядка 20 АМП, биохимически выделенных из 8 видов пресноводных аннелид, включая 4 пиявок. Первым аннелидным АМП был богатый пролином люмбрицин-1, выделенный из дождевого червя *Lumbricus rubellus* (Cho et al., 1998), а затем его аналог был найден у пиявок (Schikorski et al., 2008). Трехмерная структура люмбрицина представлена на рис. 1. Механизм действия люмбрицин-подобных АМП до сих пор не описаны. Их антимикробная активность относительно не велика. Это позволяет предположить, что защита от патогенов не является основной биологической функцией люмбрицина.

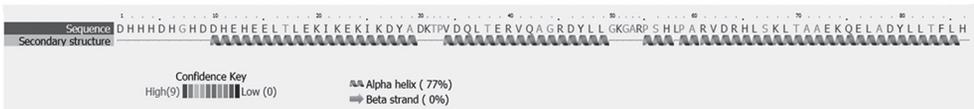
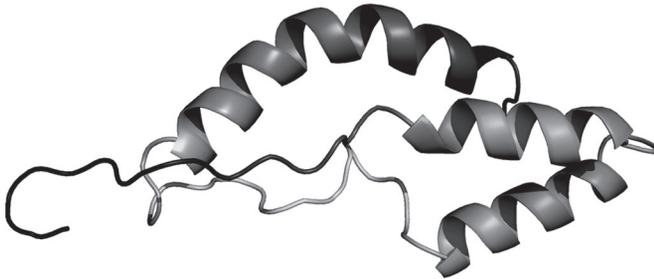


**Рисунок 1.** Трехмерная модель люмбрицина медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*, полученная с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015) на основе аминокислотной последовательности, транслированной из кДНК EU156756.

**Figure 1.** Three-dimensional model of lumbricin from the medicinal leech *Hirudo medicinalis* obtained with Phyre2 (Kelley et al., 2015). The reconstruction was based on the amino acid sequence translated from cDNA EU156756.

Следующим открытием были два разных пептида из птичьей пиявки *T. tessulatum*: теромизин (анионный АМП) и теромацин (катионный АМП) (Tasiemski et al., 2004).

Теромизин является линейным полипептидом, состоящим из 86 аминокислотных остатков. В третичной структуре этого пептида присутствуют три  $\alpha$ -спирали (рис. 2). Это первый анионный антимикробный пептид, описанный у беспозвоночных. Теромизин проявляет активность, направленную против грамположительных бактерий (Tasiemski et al., 2004). Синтез полипептида наблюдается исключительно в диффузной ткани, состоящей из крупных жировых клеток, равномерно распределенных в теле пиявки и контактирующих с целомическими полостями. Уровень транскрипции теромизина у пиявки регулируется иммунным стимулом и повышается после приема пищи или бактериального заражения. Кроме того, теромизин был иммунодетектирован в целомической жидкости и кишечном эпителии (Tasiemski et al., 2004).

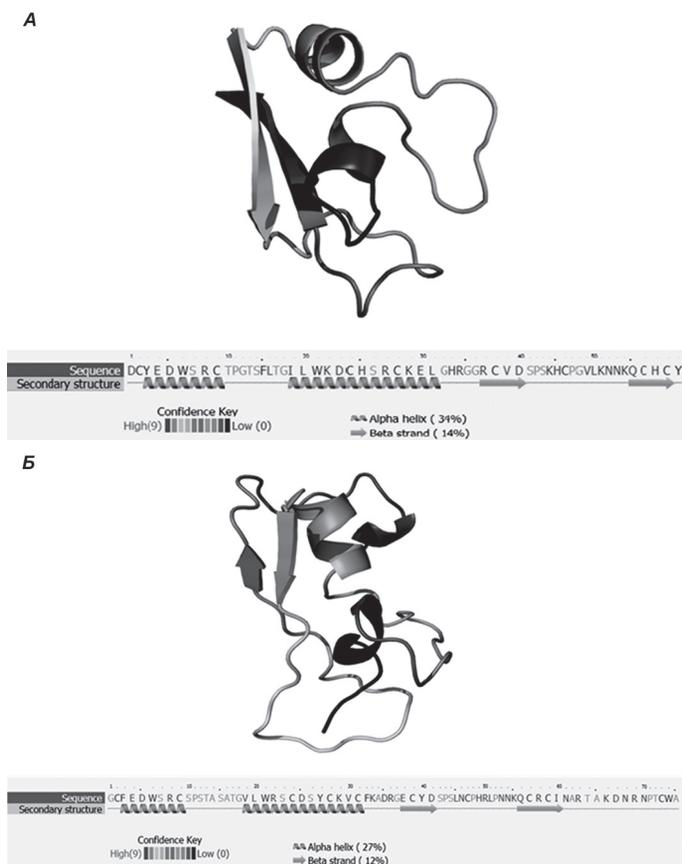


**Рисунок 2.** Трехмерная модель теромизина птичьей пиявки *Theromyzon tessulatum*, реконструированная с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015) на основе аминокислотной последовательности (MedGen UID: 265817).

**Figure 2.** Three-dimensional model of theromyzin from the bird leech *Theromyzon tessulatum*, reconstructed with Phyre2 (Kelley et al., 2015) basing on the amino acid sequence (MedGen UID: 265817).

Теромацин принадлежит к семейству мацинов, впервые идентифицированных у птичьих пиявок (Tasiemski et al., 2004). Мацины представляют собой семейство катионных АМП, богатых цистеином. Они имеют общий мотив CS $\alpha$  $\beta$ , также характерный для дефенсинов беспозвоночных и токсино-подобных пептидов, найденных у скорпионов (Jung et al., 2012). Представители этого семейства пептидов были описаны у пиявок *Theromyzon tessulatum* (Tasiemski et al., 2004) и *Hirudo medicinalis* (Schikorski et al., 2008). Обе пиявки являются эктопаразитическими гематофагами позвоночных. В отличие от дефенсинов, мацины обладают нейротрофической и пролиферативной активностью в дополнение к их бактерицидному эффекту (Schikorski et al., 2008; Jung et al., 2012). АМП мацинового ряда представляют собой довольно длинные и сложные молекулы, в состав которых входят не менее 60 остатков. Третичная структура мацинов организована в узловатую складку в соответствии с расположением цистеи-

новых связей, а молекулярные поверхности пептидов разделены на два гидрофобных полушария благодаря полосообразному распределению положительных зарядов (Jung et al., 2012). Консервативными структурными особенностями пептидов маминового семейства являются дополнительная  $\alpha$ -спираль в N-концевом положении (рис. 3 и 4) и две длинные гибкие петли (показаны в виде стрелок).



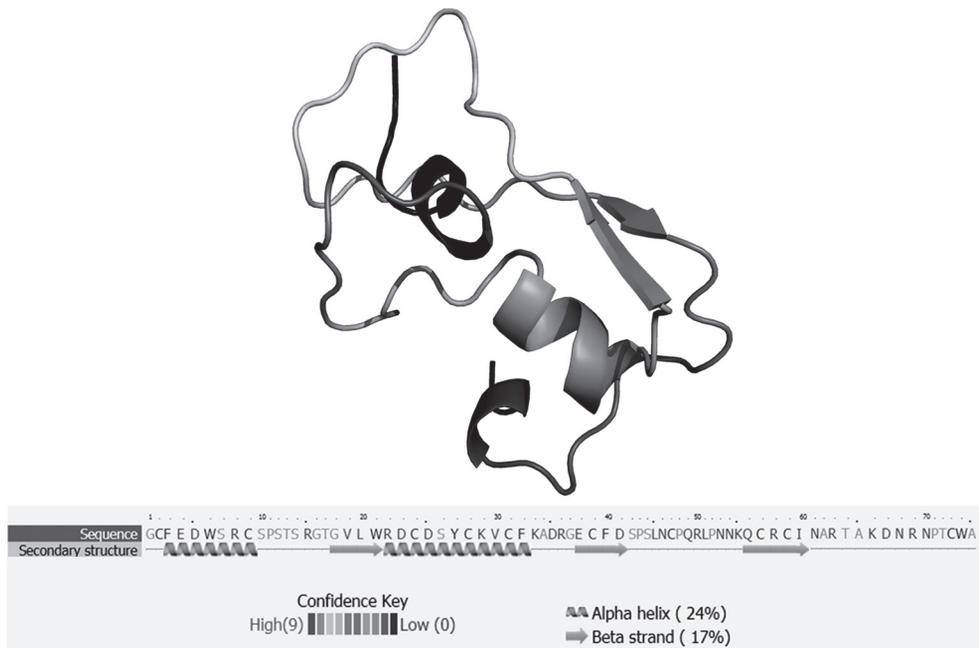
**Рисунок 3.** Трехмерные модели двух теромацинов, реконструированные с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015). *А* – теромацин птичьей пиявки *Theromyzon tessulatum* (аминокислотная последовательность AP01556). *Б* – теромацин медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* (аминокислотный транслят кДНК EU16497).

**Figure 3.** Three-dimensional models of two theromacins reconstructed with Phyre2 (Kelley et al., 2015). *A* – theromacin of the bird leech *Theromyzon tessulatum* (amino acid sequence AP01556). *B* – theromacin of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* (amino acid translate of cDNA EU16497).

Теромацины обеих пиявок состоят из 75 а. о. (Tasiemski et al., 2004; Schikorski et al., 2008). На рис. 3 показаны открытые циклические структуры теромацинов из птичьей и медицинской пиявок (рис. 3А и 3Б соответственно), которые имеют сходные элементы в третичных структурах, несмотря на 8%-ную разницу в аминокислотных последовательностях. В отличие от других цистеин-богатых АМП беспозвоночных,

теромацины пиявок имеют другой набор дисульфидных мостиков из-за большого количества остатков цистеина (Bulet, Stöcklin, 2005). Теромацины проявляют антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий (*B. megaterium* и *M. luteus*) (Jung et al., 2012) и низкую антибактериальную активность против грамотрицательных протеобактерий (*E. coli*) (Tasiemski et al., 2004). Их антимикробная активность снижается с увеличением концентрации солей (Jung et al., 2012), что может свидетельствовать о наличии теромацинов исключительно у пресноводных пиявок.

Нейромацин (рис. 4), выделенный из медицинской пиявки, состоит из 59 а. о. и на сегодняшний день является самым коротким АМП маминового ряда. Этот пептид имеет общую схему строения с другими АМП маминового ряда. Нейромацин вырабатывается нейронами и обладает высокой активностью в отношении грамположительных бактерий (Schikorski et al., 2008). В отличие от теромацина в первичной структуре нейромацина содержится четыре остатка гистидина, что повышает его антимикробную активность в слабощелочной среде. В дополнение к антибактериальным свойствам нейромацин действует как промотор регенеративного процесса центральной нервной системы (ЦНС) пиявки. Общеизвестно, что ЦНС кольчатых червей, включая пиявок, в отличие от ЦНС других животных, обладает способностью довольно быстро регенерировать нейриты и синаптические связи, которые после травмы восстанавливают нормальную функцию. Согласно экспериментальным данным, регенеративный процесс у медицинской пиявки усиливается бактериальной инфекцией, а индукция регенерации нормальной функции ЦНС в значительной степени зависит от одновременного нейроиммунного ответа (Schikorski et al., 2008).

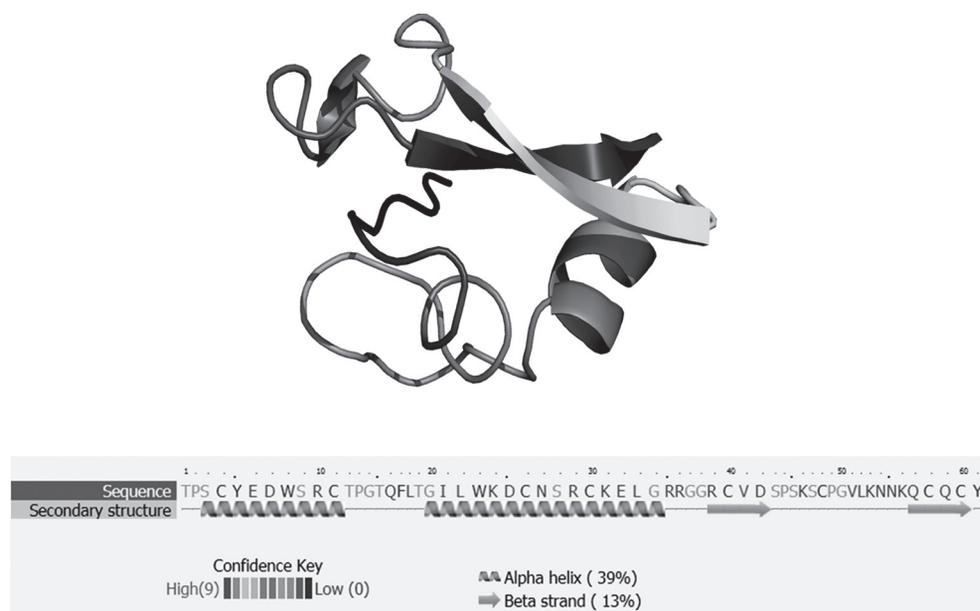


**Рисунок 4.** Трехмерная модель нейромацина пиявки *Hirudo medicinalis*, реконструированная с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015) на основе аминокислотной последовательности AP02025.

**Figure 4.** Three-dimensional model of neuromacin from the leech *Hirudo medicinalis* reconstructed with Phyre2 (Kelley et al., 2015) basing on the amino acid sequence AP02025.

Таким образом, теромацин из *T. tessulatum* (Tasiemski et al., 2004), нейромацин и теромацин из *H. medicinalis* (Schikorski et al., 2008) выполняют несколько функций, включая защиту от патогенов внешней среды, обеспечение кишечного симбиоза и иммунную защиту, а также участвуют в регенерации поврежденной нервной системы.

Недавно в слюнной железе азиатской гематофаговой пиявки *Hirudo nipponica* был обнаружен новый АМП гирудомацин, последовательность которого состоит из 61 аминокислотных остатков (Ding et al., 2019). Гирудомацин содержит 8 остатков цистеина, образующих 4 дисульфидных мостика, и структурно демонстрирует наибольшее сходство с членами семейства мацинов. Водородные связи стабилизируют конформацию гирудомацина с образованием вторичных структур, таких как  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -лист (рис. 5). Зрелый полипептид проявляет антимикробное действие широкого спектра против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Синтез гирудомацина у *Hirudo nipponica* активируется на стадии питания в присутствии крови позвоночного хозяина.



**Рисунок 5.** Трехмерная модель гирудомацина пиявки *Hirudo nipponica*, предсказанная с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015) на основе аминокислотной последовательности, транслированной из кДНК MH686152.

**Figure 5.** Three-dimensional model of hirudomacin from the leech *Hirudo nipponica* predicted with Phyre2 (Kelley et al., 2015) basing on the amino acid translate from cDNA MH686152.

Другим семейством АМП, богатых цистеином и обнаруженных у аннелид, является BRICHOS, первым участником которого был ареницин, выделенный из целомической жидкости морской полихеты *Arenicola marina* (Ovchinnikova et al., 2004). В настоящее время домен BRICHOS описан для предшественников таких АМП, как альвинеллацин и капителлацин (Tasiemski et al., 2014), а также никомицин (Panteleev et al., 2018). Вторичная структура большинства пептидов этого семейства характеризуется наличием  $\beta$ -шпильки, стабилизированной одним или двумя дисульфидными мостиками

(Tasiemski et al., 2014), однако имеются сведения о нахождении домена BRICHOS в составе предшественников  $\alpha$ -спиральных АМП, в структуре которых отсутствуют  $\beta$ -шпильки (Panteleev et al., 2018).

Белки-предшественники этих АМП участвуют в основном в хемотаксисе клеток. Имеются свидетельства того, что BRICHOS участвует в сложном посттрансляционном процессинге белков и функционирует как внутримолекулярный шаперонный домен, который может связывать мотивы  $\beta$ -шпилек и предотвращать их самоагрегацию с образованием амилоидных фибрилл (Tasiemski et al., 2014). Присутствие домена BRICHOS может быть эволюционно обусловленной адаптацией пиявок, обеспечивающей корректное сворачивание их АМП в экстремальных условиях, например при недостатке кислорода (гипоксии) и термических нагрузках.

### Механизм действия

Основные физические свойства АМП – катионный заряд и значительная доля гидрофобных остатков. Первое свойство способствует селективности отрицательно заряженных микробных цитоплазматических мембран по отношению к цвиттер-ионным мембранам многоклеточных, тогда как второе способствует взаимодействию с ацильными цепями жирных кислот (Lohner, 2001).

Многие линейные АМП не структурированы в водном растворе и требуют мембранной среды для принятия стабильной амфипатической конформации. Хотя механизм действия многих АМП включает в себя разные способы нарушения целостности бактериальной цитоплазматической мембраны, стали известны и другие антимикробные механизмы, которые нацелены на ключевые клеточные процессы, включая синтез ДНК и белка, укладку белка, ферментативную активность и синтез клеточной стенки (Brogden, 2005; Nicolas, 2009). Действительно, катионные свойства АМП способствуют взаимодействию с отрицательно заряженными фрагментами других биомолекул, таких как липиды внешней мембраны, нуклеиновые кислоты и фосфорилированные белки. У инфицированного животного может одновременно выделяться несколько изоформ или структурно сходных АМП, которые действуют с помощью разных механизмов для достижения общего синергетического эффекта (Mangoni, Shai, 2009). Кроме того, некоторые АМП могут иметь несколько вариантов действия (стратегия множественных попаданий), что повышает их эффективность и способствует уклонению от потенциальных механизмов резистентности.

Таким образом, АМП по механизму действия можно условно разделить на два класса: мембраноактивные (membrane disruptor) и внемембраноактивные (non-membrane disruptor) (Huerta-Cantillo, Navarro-García, 2016); и в том и другом случае изначальной целью является взаимодействие с плазматической мембраной посредством электростатических зарядов.

Пептиды, разрушающие мембрану, составляют подавляющее большинство, и многие из них имеют  $\alpha$ -спиральные структуры, которые непосредственно действуют на уровне плазматической мембраны, изменяя проницаемость клеток или лизируя клетки посредством образования пор. Мембраноактивные АМП можно подразделить на две группы в зависимости от их биологической активности: (1) селективные, которые активны в отношении бактерий, но неактивны в отношении клеток животного, и (2) неселективные, которые обладают активностью в отношении обоих типов клеток.

Механизм действия  $\alpha$ -спиральных АМП определяется следующими этапами (по: Huerta-Cantillo, Navarro-García, 2016):

1. Электростатическое связывание АМП с фосфолипидами мембраны.

АМП располагаются на мембране так, чтобы их положительно-заряженные аминокислоты спрягались с отрицательно-заряженными головками фосфолипидов. Это позволяет АМП оставаться параллельно ориентированными на мембране при низкой локальной концентрации пептида. В таком состоянии АМП остаются неактивными.

2. Когда локальная концентрация пептида увеличивается, у него возникает тенденция принимать перпендикулярную ориентацию по отношению к мембране. В таком положении пептид становится активным и внедряется в мембрану.

3. Наконец, введение пептидов изменяет проницаемость липидного бислоя, или лизис клеток происходит путем образования поры бочкообразного типа или нарушения структуры тороидальных пор.

АМП, не связанные с мембранами (внемембранные), используют разнообразные механизмы действия, среди которых: связывание с нуклеиновыми кислотами (ДНК или РНК), вмешательство в синтез нуклеиновых кислот, ингибирование синтеза белков, ингибирование ферментативной активности, ингибирование синтеза клеточной стенки, повреждение клеток в результате накопления пептидов внутри клетки, флокуляция внутриклеточных компонентов, структурные изменения в перегородках и блокирование некоторых факторов вирулентности (Brogden, 2005; Nguyen et al., 2011), что подавляет подвижность бактерии или снижает ее патогенность, тем самым позволяет контролировать заражение.

Помимо своей прямой антимикробной активности, АМП могут выполнять функцию защиты организма пиявки с помощью иммуномодулирующих механизмов (Zhang, Gallo, 2016), таких как хемотаксическая активность, привлекающая иммунные клетки; модуляция чувствительности клеток пиявки к лигандам толл-подобных рецепторов; стимуляция ангиогенеза при регенерации повреждённых тканей, ликвидации очагов воспаления, образовании рубца и других подобных процессах восстановления; модуляция экспрессии противовоспалительных цитокинов или хемокинов.

Особую роль АМП играют в качестве врожденных регуляторов в кишечнике (Muniz et al., 2012). Кишечный эпителий подвергается воздействию множества патогенов, поэтому эндогенные АМП необходимы здесь для защиты от чужеродных внедрений и инфекций. Становится все более очевидным, что АМП формируют состав комменсальной микробиоты и помогают поддерживать кишечный гомеостаз у пиявок и не только (Tasiemski et al., 2015). Экспрессия АМП строго контролируется вовлечением рецепторов распознавания образов, и их нарушение связано с аномальными реакциями организма на инфекцию и воспалительные заболевания кишечника.

Механизм действия мацинов, как и других катионных АМП, включает повышение проницаемости мембраны грамположительных бактерий, а также образование пор (Boidin-Wichlacz et al., 2012). Благодаря структурным особенностям и двойному амфипатическому действию (два гидрофобных полушария, зажатых поясом положительных зарядов), мацины способствуют агрегации бактерий, а затем проникают бактериальную мембрану. В дополнение к антибактериальной активности нейромацин и теромацин участвуют в регенерации нервных волокон (Jung et al., 2012; Schikorski et al., 2008). У медицинской пиявки *H. medicinalis* теромацин выделяется в кровь, окружающую нервную систему, а нейромацин продуцируется нервными клетками и накапливается в пораженном участке центральной нервной системы (Tasiemski, Salzet, 2010), тогда как теромацин птичьей пиявки *T. tessulatum* экспрессируется в крупных жировых клетках и сразу же высвобождается в целомическую жидкость после инфекций или повреждений центральной нервной системы (Jung et al., 2012; Tasiemski et al., 2004).

## Применение АМП

Структурные и функциональные характеристики АМП, а также такие их свойства, как низкая токсичность для эукариотических клеток, широкий спектр действия против различных патогенных микроорганизмов и иммуномодулирующие эффекты делают АМП ценными терапевтическими и профилактическими агентами (Dubin et al., 2005). Несмотря на то, что остаются некоторые ограничения, контроль уровня АМП может представлять собой важную парадигму для лечения широкого спектра заболеваний человека и животных.

Косвенные функции АМП, одной из которых является их участие в формировании состава комменсальной микробиоты животных и человека, тоже интересны для практического применения в медицине. Нарушение стабильности микробиома может привести к серьезным последствиям для здоровья, включая ожирение, рецидивирующие инфекции и таким заболеваниям, как синдром воспаленного кишечника и атопический дерматит. Как оказалось, зачастую перечисленные симптомы клинически связаны с дефектными антибактериальными механизмами, в частности с дефицитом дефензинов (Zhang, Gallo, 2016). Избыточный синтез АМП, в свою очередь, может инициировать воспалительные заболевания. Такие заболевания кожи, как псориаз и розацеа сопровождаются повышенным уровнем экспрессии АМП кателицидина (Zhang, Gallo, 2016). Учитывая роль пептидов в качестве модуляторов врожденного иммунного ответа, АМП могут быть потенциально пригодны для разработки иммуномодулирующих методов лечения или для коррекции подобных нарушений.

Основной интерес, проявляемый к АМП, связан с перспективой их использования в качестве кардинально новых противоифекционных средств следующего поколения и новых методов более избирательной борьбы с патогенами, что, несомненно, важно для решения общечеловеческих проблем, связанных со снижением эффективности обычных антибиотиков из-за возросшей лекарственной устойчивости патогенных бактерий. Механизм, с помощью которого действуют эти пептиды, очень затрудняет выработку устойчивости бактерий, что открывает многообещающую перспективу применения АМП в качестве более стойких терапевтических агентов. Важным преимуществом АМП является отсутствие у микроорганизмов механизма наследственной передачи устойчивости к ним; в отличие от традиционных антибиотиков, применение АМП в лечебных целях не влияет на естественную микрофлору пациентов (Afacan et al., 2012). Еще одним плюсом АМП является их способность распознавать определенные типы плазматических мембран, и эта селективность позволяет им дифференцированно распознавать нормальные клетки, клетки незлокачественной опухоли и клетки злокачественной опухоли, потому АМП могут быть использованы в лечении онкологических заболеваний (Huerta-Cantillo, Navarro-García, 2016).

АМП соответствуют многим требованиям фармацевтической промышленности, сельского хозяйства, аквакультуры и производства продуктов питания. Некоторые АМП уже нашли свое применение. АМП бактерий (бактериоцины) используются для ингибирования важных патогенов животных, людей и растений, в том числе энтеротоксиногенной *E. coli*, резистентных стафилококков и энтерококков, *Agrobacterium* и *Brenneria* spp. (Yang et al., 2014). Например, бактериальный пептид низин широко используется в качестве безопасного пищевого консерванта, для сохранения свежести роз и лечения рыб. Дефенсины и кателицидины млекопитающих оказались активны против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и других венерических заболева-

ний (Brogden, 2005). АМП из кожи лягушки обладают спермицидной активностью и могут найти применение в качестве негормональных противозачаточных средств (Zairi et al., 2009). В растениеводстве на замену токсичных для человека и окружающей среды пестицидов приходят трансгенные растения, экспрессирующие антимикробные пептиды (Nawrot et al., 2014). Манипулирование генами, кодирующими АМП у крабов, креветок и мидий, позволяет получать пригодные для культивирования организмы, более устойчивые к болезням (Ponnappan et al., 2015). Что касается пиявок, их антикоагулирующее действие было издревле известно и до сих пор используется в гирудотерапии как в Европе, так и в Азии (Singh, 2010). В наши дни практический интерес к пиявкам возобновился. Как оказалось, в процессе кровососания пиявки-гематофаги выделяют не только гирудин, но и другие биологически активные вещества для предотвращения коагуляции и гниения (Ding et al., 2019). Пептиды пиявок имеют много важных преимуществ, наиболее специфичным из которых является способность преодолевать иммунный ответ при восстановлении нервной системы (Boidin-Wichlacz et al., 2012). К преимуществам фармацевтических разработок на основе АМП пиявок относятся биохимическая совместимость с позвоночным хозяином, нетоксичность для комменсальной микрофлоры, термостабильность, солеустойчивость и широкий спектр антимикробной активности (Bruno et al., 2019). Несмотря на разнообразие жизненных стратегий, имеющих у пиявок (паразиты/непаразиты; специалисты/генералисты; эндемики/космополиты; экстремофилы/нейтрофилы и т.д.), АМП исследованы только у ограниченного числа гематофаговых видов, паразитирующих на позвоночных. Это открывает широкую перспективу для поиска новых, возможно, уникальных АМП.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Орели Тазиемски и Франсуа Массоллю (Институт Пастера, Франция) за инициацию и поддержание интереса к данной теме.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 0279-2021-0011 при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-29-05097\_офи м).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ливанов Н. А. 1905. *Acanthobdella peledina* Grube, 1851. Морфологическое исследование. Ученые записки Казанского университета 72 (5–8): 1–266. [Livanow N. 1905. *Acanthobdella peledina* Grube, 1851. Morphological Study. Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta 72: 1–266. (in Russian)]
- Afacan N.J., Yeung A.T., Pena O.M., Hancock R.E. 2012. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Current Pharmaceutical Design* 18 (6): 807–819. <https://doi.org/10.2174/138161212799277617>
- Ageitos J.M., Sánchez-Pérez A., Calo-Mata P., Villa T.G. 2017. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology* 133 (6): 117–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>
- Baskova I.P., Zavalova L.L., Basanova A.V., Sass A.V. 2001. Separation of monomerizing and lysozyme activities of destabilase from medicinal leech salivary gland secretion. *Biochemistry* 66: 1368–1373. <https://doi.org/10.1023/A:1013333829196>
- Beschin A., Bilej M., Brys L., Torreele E., Lucas R., Magez S., De Baetselier P., 1999. Convergent evolution of cytokines. *Nature* 400: 627–628. <https://doi.org/10.1038/23164>
- Boidin-Wichlacz C., Vergote D., Slomianny C., Jouy N., Salzet M., Tasiemski A. 2012. Morphological and functional characterization of leech circulating blood cells: role in immunity and neural repair. *Cellular and Molecular Life Science* 69 (10): 1717–1731. DOI 10.1007/s00018-011-0897-x
- Bowdish D.M.E., Hancock R.E.W. 2005. Anti-endotoxin properties of cationic host defence peptides and proteins. *Journal of Endotoxin Research* 11 (4): 230–236. <https://doi.org/10.1177/2F09680519050110040801>
- Brogden K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>

- Bruno R., Maresca M., Canaan S., Cavalier J.F., Mabrouk K., Boidin-Wichlacz C., Olleik H., Zeppilli D., Brodin P., Massol F., Jollivet D., Jung S., Tasiemski A. 2019. Worms' antimicrobial peptides. *Marine Drugs* 17: 512. <https://doi.org/10.3390/md17090512>
- Bulet P., Stöcklin R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters* 12 (1): 3–11. <https://doi.org/10.2174/0929866053406011>
- Burrell B.D., Sahley C.L., Muller K.J. 2003. Progressive recovery of learning during regeneration of a single synapse in the medicinal leech. *Journal of Comparative Neurology* 457: 67–74. <https://doi.org/10.1002/cne.10530>
- Cho J.H., Park C.B., Yoon Y.G., Kim S.C. 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: Purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease* 1408 (1): 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(98\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00058-1)
- Cooper E.L., Cossarizza A., Suzuki M.M., Salvioli S., Capri M., Quaglino D., Franceschi C. 1995. Autogeneic but not allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K562. *Cellular Immunology* 166: 113–122. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.0013>
- Cooper E.L., Kauschke E., Cossarizza A. 2001. Annelid humoral immunity: cell lysis in earthworms. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 484: 169–183. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2_15)
- Cossarizza A., Cooper E.L., Quaglino D., Salvioli S., Kalachnikova G., Franceschi C. 1995. Mitochondrial mass and membrane potential in coelomocytes from the earthworm *Eisenia foetida*: studies with fluorescent probes in single intact cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214 (2): 503–510. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2315>
- Davidson D.J., Currie A.J., Reid G.S.D., Bowdish D.M.E., MacDonald K.L., Ma R.C., Hancock R.E.W., Speert D.P. 2004. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *Journal of Immunology*, 172 (2): 1146–1156. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1146>
- de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G., Valvassori R., Cooper E.L., Lanzavecchia G. 2000. Different types of response to foreign antigens by leech leukocytes. *Tissue and Cell* 32 (1): 40–48. <https://doi.org/10.1054/tice.1999.0085>
- de Eguileor M., Tettamanti G., Grimaldi A., Congiu T., Ferrarese R., Perletti G., Valvassori R., Cooper E.L., Lanzavecchia G. 2002. Leeches: immune response, angiogenesis and biomedical applications. *Current Pharmaceutical Design* 9: 133–147 <https://doi.org/10.2174/1381612033392198>
- Dhainaut A., Scaps P. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian Journal of Zoology* 79: 233–253. <https://doi.org/10.1139/z00-196>
- Dinarello C.A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118 (2): 503–508. <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>
- Ding A., Shi H., Guo Q., Liu F., Wang J., Cheng B., Wei W., Xu C. 2019. Gene cloning and expression of a partial sequence of Hirudomacin, an antimicrobial protein that is increased in leech (*Hirudo nipponica* Whitman) after a blood meal. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 231: 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.02.005>
- Dubin A., Mak P., Dubin G., Rzychon M., Stec-Niemczyk J., Władyka B., Maziarka K., Chmiel D. 2005. New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochimica Polonica* 52 (3): 633–638. [http://www.actabp.pl/#File?./html/3\\_2005/633.html](http://www.actabp.pl/#File?./html/3_2005/633.html)
- Hanusova R., Bilej M., Brys L., De-Baetselier P., Beschin A. 1999. Identification of a coelomic mitogenic factor in *Eisenia foetida* earthworm. *Immunology Letters* 65 (3): 203–211. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00111-4)
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A.Jr., Ezekowitz R.A.B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313–1318. DOI: 10.1126/science.284.5418.1313
- Huerta-Cantillo J., Navarro-García F. 2016. Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells. *Investigación en Discapacidad*, 5 (2): 96–115. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2016/ir162d.pdf>
- Hultmark D., Engström Å., Andersson K., Steiner H., Bennich H., Boman H. 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *The EMBO Journal* 2: 571–576. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01465.x>
- Jung S., Sönnichsen F.D., Hung C.-W., Tholey A., Boidin-Wichlacz C., Haeusgen W., Gelhaus C., Desel C., Podschun R., Waetzig V., Tasiemski A., Leippe M., Grötzinger J. 2012. Macin family of antimicrobial proteins combines antimicrobial and nerve repair activities. *Journal of Biological Chemistry* 287: 14246–14258. doi: 10.1074/jbc.M111.336495
- Kauschke E., Pagliara P., Stanbili L., Cooper E.L. 1997. Characterization of proteolytic activity in coelomic fluid of *Lumbricus terrestris* (Annelida, Lumbricidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 116 (2): 235–242. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(96\)00248-9](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(96)00248-9)

- Kaygorodova I.A. 2012. A revised checklist of the Lake Baikal Hirudinida fauna. *Lauterbornia* 75: 49–62.
- Kaygorodova I.A., Bolbat N.B., Bolbat A.V. 2020. Species delimitation through DNA barcoding of freshwater leeches of the *Glossiphonia* genus (Hirudinea: Glossiphoniidae) from Eastern Siberia, Russia. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* (in press) <https://doi.org/10.1111/jzs.12385>
- Kaygorodova I.A., Dzyuba E.V., Pronin N.M. 2012. Leech-like parasites (Clitellata, Acanthobdellida) infecting native and endemic Eastern Siberian salmon fishes. *The Scientific World Journal* 2012: 652827. <https://doi.org/10.1100/2012/652827>
- Kaygorodova I.A., Sherbakov D. Yu. 2006. Molecular phylogenetic study of systematic position of Baikalian oligochaetes in Clitellata. *Russian Journal of Genetics* 42 (12): 1390–1397. <https://doi.org/10.1134/S1022795406120052>
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J.E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10: 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Lassegues M., Milochau A., Doignon F., Du Pasquier L., Valembois P. 1997. Sequence and expression of an *Eisenia fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein. *European Journal of Biochemistry* 246 (3): 756–762. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00756.x>
- Lefebvre C., Cocquerelle C., Vandenbulcke F., Hot D., Huot L., Lemoine Y., Salzet M. 2004. Transcriptomic analysis in the leech *Theromyzon tessulatam*: involvement of cystatin B in innate immunity. *Biochemical Journal* 380 (3): 617–625. <https://doi.org/10.1042/bj20040478>
- Lohner K. 2001. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In: Lohner K., (ed.) *Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies*. Wymondham, Norfolk, Horizon Scientific Press, 149–165
- Loker E.S., Adema C.M., Zhang S.M., Kepler T.B. 2004. Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews* 198 (1): 10–24. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>
- Macagno E.R., Gaasterland T., Edsall L., Bafna V., Soares M.B., Scheetz T., Casavant T., Da Silva C., Wincker P., Tasiemski A., Salzet M. 2010. Construction of a medicinal leech transcriptome database and its application to the identification of leech homologs of neural and innate immune genes. *BMC Genomics* 11: 407. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-407>
- Macke E., Tasiemski A., Callens M., Decaestecker E., Massol F. 2017. Life history and eco-evolutionary dynamics in light of the gut microbiota. *Oikos* 126 (4): 508–531. <https://doi.org/10.1111/oik.03900>
- Mangoni M.L., Shai Y. 2009. Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1788 (8): 1610–1619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.021>
- McDougall C., Hui J.H.L., Monteiro A., Takahashi T., Ferrier D.E.K. 2008. Annelids in evolutionary developmental biology and comparative genomics. *Parasite*, 15 (3): 321–328. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153321>
- Milochau A., Lassegues M., Valembois P. 1997. Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology* 1337 (1): 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00160-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00160-4)
- Mookherjee N., Hancock R.E.W. 2007. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (7-8): 922–933. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6>
- Muniz L.R., Knosp C., Yeretsian G. 2012. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Frontiers in Immunology* 3: 310. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00310>
- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., Goździcka-Józefiak A. 2014. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica* 59 (3): 181–196. DOI: 10.1007/s12223-013-0280-4
- Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology* 29 (9): 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Nicolas P. 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular targeting antimicrobial peptides. *The FEBS Journal* 276 (22): 6483–6496. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07359.x>
- Nissen-Meyer J., Nes I.F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology* 167 (2-3): 67–77. <https://doi.org/10.1007/s002030050418>
- Ovchinnikova T.V., Aleshina G.M., Balandin S.V., Krasnodembskaya A.D., Markelov M.L., Frolova E.I., Leonova Y.F., Tagaev A.A., Krasnodembsky E.G., Kokryakov V.N. 2004. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. *FEBS Letters* 577 (1-2): 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.012>

- Pantelev P.V., Tsarev A.V., Bolosov I.A., Paramonov A.S., Marggraf M.B., Sychev S.V., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. 2018. Novel Antimicrobial Peptides from the Arctic Polychaeta *Nicomache minor* Provide New Molecular Insight into Biological Role of the BRICHOS Domain. *Marine Drugs* 16 (11): 401. <https://doi.org/10.3390/md16110401>
- Pasupuleti M., Schmidtchen A., Malmsten M. 2012. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology* 32 (2): 143–171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
- Perin J., Jolles P. 1972. The lysozyme from *Nephtys hombergi* (annelid). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure* 263 (3): 683–689. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(72\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(72)90051-7)
- Pfeiffer I., Brenig B., Kutschera U. 2005. Molecular phylogeny of selected predaceous leeches with reference to the evolution of body size and terrestriality. *Theory in Biosciences* 124 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.tbio.2005.05.002>
- Ponnappan N., Budagavi D.P., Yadav B.K., Chugh A. 2015. Membrane-active peptides from marine organisms-antimicrobials, cell-penetrating peptides and Peptide toxins: applications and prospects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 7 (1): 75–89. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9182-2>
- Prochazkova P., Roubalova R., Dvorak J., Navarro Pacheco N.I., Bilej M. 2020. Pattern recognition receptors in annelids. *Developmental & Comparative Immunology* 102: 103493. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103493>
- Quaglino D., Cooper E.L., Salvioli S., Capri M., Suzuki M.M., Ronchetti I.P., Franceschi C., Cossarizza A. 1996. Earthworm coelomocytes *in vitro*: cellular features and “granuloma” formation during cytotoxic activity against the mammalian tumor cell target K562. *European Journal of Cell Biology* 70 (3): 278–288.
- Salzet M., Capron A., Stefano G. 2000. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitology Today*, 16 (12): 536–540. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01787-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01787-7)
- Salzet M., Tasiemski A., Cooper E. 2006. Innate Immunity in Lophotrochozoans: The Annelids. *Current Pharmaceutical Design* 12(24): 3043–3050. <https://doi.org/10.2174/138161206777947551>
- Sawyer R. 1986. *Leech biology and behavior, Vol. II. Feeding Biology, Ecology, and Systematics*. Suffolk, Clarendon Press, Oxford, 793 p.
- Schikorski D., Cuvillier-Hot V., Leippe M., Boidin-Wichlacz C., Slomianny C., Macagno E., Salzet M., Tasiemski A. 2008. Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *Journal of Immunology* 181 (2): 1083–1095. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1083>
- Silver A.C., Graf J. 2011. Innate and procured immunity inside the digestive tract of the medicinal leech. *Invertebrate Survival Journal* 8 (2): 173–178. <http://www.isj.unimo.it/index.php/ISJ/article/view/246>
- Singh A.P. 2010. Medicinal leech therapy (Hirudotherapy): a brief overview. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 16 (4): 213–215. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.11.005>
- Sket B., Trontelj P. 2008. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 129–137. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9010-8>
- Suzuki M.M., Cooper E.L. 1995. Allogeneic killing by earthworm effector cells. *Natural Immunity* 14 (1): 11–19.
- Tasiemski A., Jung S., Boidin-Wichlacz C., Jollivet D., Cuvillier-Hot V., Pradillon F., Vetriani C., Hecht O., Sönrichsen F.D., Gelhaus C., Hung C.W., Tholey A., Leippe M., Grötzinger J., Gaill F. 2014. Characterization and function of the first antibiotic isolated from a vent organism: the extremophile metazoan *Alvinella pompejana*. *PLoS ONE* 9: e95737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095737>
- Tasiemski A., Massol F., Cuvillier-Hot V., Boidin-Wichlacz C., Roger E., Rodet F., Fournier I., Thomas, F., Salzet M. 2015. Reciprocal immune benefit based on complementary production of antibiotics by the leech *Hirudo verbana* and its gut symbiont *Aeromonas veronii*. *Scientific Reports* 5: 17498. <https://doi.org/10.1038/srep17498>
- Tasiemski A., Salzet M. 2010. Leech immunity: from brain to peripheral responses. In: Söderhäll K. (ed.) *Invertebrate Immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA., Springer., Vol 708, 80–104. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_5)
- Tasiemski A., Vandenbulcke F., Mitta G., Lemoine J., Lefebvre C., Sautiere P.E., Salzet M. 2004. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 30973–30982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312156200>
- Trontelj P., Sket B., Steinbrück G. 1999. Molecular phylogeny of leeches: Congruence of nuclear and mitochondrial rDNA data sets and the origin of bloodsucking. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 37 (3): 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1999.00114.x>
- Tučková L., Rejnek J., Bilej M., Pospišil R. 1991. Characterization of antigen-binding protein in earthworms *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Developmental & Comparative Immunology* 15 (4): 263–268. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(91\)90019-U](https://doi.org/10.1016/0145-305X(91)90019-U)

- Wiesner J., Vilcinskas A. 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1(5): 440–464. <https://doi.org/10.4161/viru.1.5.12983>
- Wu W.K., Wong C.C., Li Z.J., Zhang L., Xiang S.X., Cho C.H. 2010. Cathelicidins in inflammation and tissue repair: Potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders. *Acta Pharmacologica Sinica* 31 (9): 1118–1122. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.117>
- Yang S.C., Lin C.H., Sung C.T., Fang J.Y. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* 5: 241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>
- Yeaman M.R., Yount N.Y. 2007. Unifying themes in host defence effector polypeptides. *Nature Reviews Microbiology* 5: 727–740. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1744>
- Zairi A, Tangy F, Bouassida K., Hani K. 2009. Dermaseptins and magainins: antimicrobial peptides from frogs' skin-new sources for a promising spermicides microbicides-a mini review. *BioMed Research International* 2009: 452567. <https://doi.org/10.1155/2009/452567>
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zhang L.J., Gallo R.L. 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology* 26 (1): R14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>
- Zhang M., Zhao J., Zheng J. 2014. Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. *Soft Matter* 10 (38): 7425–7451. <https://doi.org/10.1039/C4SM00907J>

## THE ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDS IN THE IMMUNITY OF PARASITIC LEECHES (ANNELIDA, HIRUDINEA)

I. A. Kaygorodova

**Keywords:** parasitic leeches, immunity, antimicrobial peptides

### SUMMARY

Antimicrobial proteins and peptides (AMPs), essential components of the immune system, represent a diverse class of natural molecules produced by all living organisms in response to pathogen attacks. AMPs can possess a wide range of antibiotic activity against foreign and opportunistic bacteria, fungi, and viruses. AMPs play an important role in the selection of colonizing bacterial symbionts, which helps multicellular organisms to cope with certain environmental problems. AMPs are especially important for invertebrates due to the absence of an adaptive immune system. Although many AMPs have similar physical and chemical properties (common total length varying from 10 to 100 amino acids, total positive charge, or high cysteine content), their immunomodulatory activity is specific for each AMP type. The present review summarizes current state of knowledge on leech immunity, with emphasis on the special role of AMPs, and indicates the wide variety of primary AMP structures, which seems to correlate with a variety of life strategies and ecology of ectoparasites.