

БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА: ТРИАЗАВИРИНА И ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА ВИДОВОЙ СОСТАВ МИКРОБИОМА ЗИМУЮЩИХ ПЧЕЛ

*Сереженков В.А, **Кузнецова М.И., **Королев А.В.

*ФГБУ науки ФИЦ ХФ – ИХФ имени Н.Н. Семенова РАН,
г. Москва, Российская Федерация

**ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И.Скрябина,
г. Москва, Российская Федерация

Введение. Медоносные пчелы (*Apis mellifera*) являются ключевыми опылителями, играющими жизненно важную роль в поддержании экосистемы и стабильности урожайности. При микробно-патогенном заражении у насекомых проявляются высокоэффективные иммунные ответы, которые являются врожденными и включают гуморальные и клеточные реакции [1,2]. Оксид азота (NO), небольшая сигнальная молекула, которая синтезируется из L-аргинина с помощью NO-синтазы (NOS) [2,]; NO непосредственно опосредует клеточный и гуморальный иммунный ответ у насекомых.

Микробиоту пчел можно определить как сложную экосистему микроорганизмов, которая играет критическую роль в различных биохимических и физиологических механизмах, включая модуляцию гомеостаза глюкозы и липидов, регулирование насыщения, управление энергией и производство витаминов [3-5]. Одновременно микробиота проявляет антиканцерогенную и противовоспалительную активность [6] и играет важную роль в функционировании иммунной системы хозяина [7]. В свою очередь, иммунная система хозяина поддерживает мутуалистическое сожительство с микробиотой.

В многочисленных обзорах отводится центральная роль передачи сигналов NO в механизмах защиты хозяина от инфекций, вызванных вирусами, бактериями, простейшими и многоклеточными паразитами. У насекомых у нескольких видов чешуекрылых, полужесткокрылых и двукрылых, NO продуцируется как иммунная эффекторная молекула в ответ на микробную инфекцию выполняя функции цитотоксического компонента [8]. NO непосредственно влияет на развитие паразитов [9,10,].

Белок-связанные ДНКЖ с тиолатными лигандами были открыты и идентифицированы в микроорганизмах и животных в 60-е годы профессором А.Ф. Ваниным. Биологическое действие ДНКЖ с тиолатными лигандами обусловлено их способностью выступать в организме животных и человека в качестве доноров NO, NO⁺. А также способностью ДНКЖ служить источником группы Fe-(NO), присоединяться к тиоловым группам белков и модулировать их активность. Регуляторное действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на различные физиологические процессы проявляется как: вазодилаторное и гипотензивное, подавление агрегации тромбоцитов, противогипоксическое действие на миокард, повышение эластичности эритроцитов, ускорение заживления кожных ран, торможение процессов трансформации нормальных тканей кавернозного тела в фиброзную, снижение размеров некротической зоны при экспериментальном инфаркте миокарда, проапоптотическое на клетки HeLa и Jurkat в присутствии экзогенных хелаторов железа, подавление роста эндометриоидных опухолей при экспериментальном эндометриозе у животных, подавление пролиферации злокачественных опухолей на ранней стадии их развития, цитотоксическое действие на вирус Coxsackie B в ткани миокарда [11-15]

Целью проводимого исследования на пчелах являлось изучение состава микробиома зимних пчел при кормлении их 50 % медом с добавлением триазавирина и биядерного динитрозильного комплекса железа Б-ДНКЖ с глутатионом в качестве доноров оксида азота. Триазаваирин согласно имеющейся литературе используется в качестве препарата с высокой противовирусной активностью [16]. Механизм его действия, как предполагают, обусловлен взаимодействием с тиолатными соединениями клетки. Однако точный механизм блокирования развития вируса не предложен. Для исследования мы использовали зимующих пчел, отобранных из улья в феврале 2022 года.

Материалы и методы исследований. Для проведения исследований использовали 3 группы пчел (породы метис камчатский) по 150-300 особей по 2 садка, одна контрольная и две опытные, которых содержали в течении 3 недель в садках- рис.1. Питание пчел состояло из 50 % меда, прогретого до 70 С и затем охлажденного. Корм объемом 15 мл подавали посредством стеклянной пробирки, что обеспечивало свободный доступ насекомым (Рис. 1). Для обеспечения температурного режима и вентиляции садки накрывали слоем ткани. В корм первой опытной группы добавляли лекарственный препарат Триазаваирин в конечной концентрации 5,2 мкМ и 8 мкМ глутатиона. В корм второй группы вносили биядерный динитрозильный комплекс железа с тиоловым лигандом глутатионом (Б-ДНКЖ) концентрацией 80 мкМ [14]. Ежедневно проводили учет съеденного корма и подсчет числа погибших пчел. Через одну неделю отобрали по 25 пчел, а две недели спустя провели вторичный отбор для анализа кишечника на состав микробиома. Количество триазавирина поступающего в организм одной пчелы в день составляло $0,51 \pm 0,08$ мкг и $3,29 \pm 0,09$ мкг Б-ДНКЖ. Количество съеденного меда в контроле и опыте с Б-ДНКЖ было одинаковым, а в опыте с триазаваирином снижено на 24 %.

В процессе эксперимента за 21 один день гибель пчел составила в контроле- 27 %, с триазаваирином- 33 % и Б-ДНКЖ- 34 %., разница в 6-7 % не является достоверной.

Результаты исследований. Оксид азота, высвобождаемый из триазавирина в присутствии железа (2+) и N-метил-D,L-глуксаминдителиокарбамата (МГД) образует водорастворимый парамагнитный моноксидный комплекс железа МНКЖ МГД-Fe-NO с g фактором 2,04 рис 2 (спектр 1), спектр 2 без добавки глутатиона. Выход оксида азота 23 %. В работе [13] подробно описана методика регистрации выделяющего монооксида азота.

На рисунке 1 показаны спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) моноядерного ДНКЖ (М-ДНКЖ) с глутатионом спектр 1 при 20 С и спектр 2 при 77 К водных растворов. Б-ДНКЖ при рН=7,4 имеют очень низкую долю парамагнитных М-ДНКЖ, и поэтому при внесении дополнительного количества глутатиона или цистеина 1:10 и выше можно наблюдать комплексы железа 2+ , монооксида азота с тиоловыми лигандами. На рис 2 спектр 3 показан ЭПР спектр М-ДНКЖ с белком,, после того как одна группа -SH глутатиона заменена на-SH группу цистеина в белке [12].

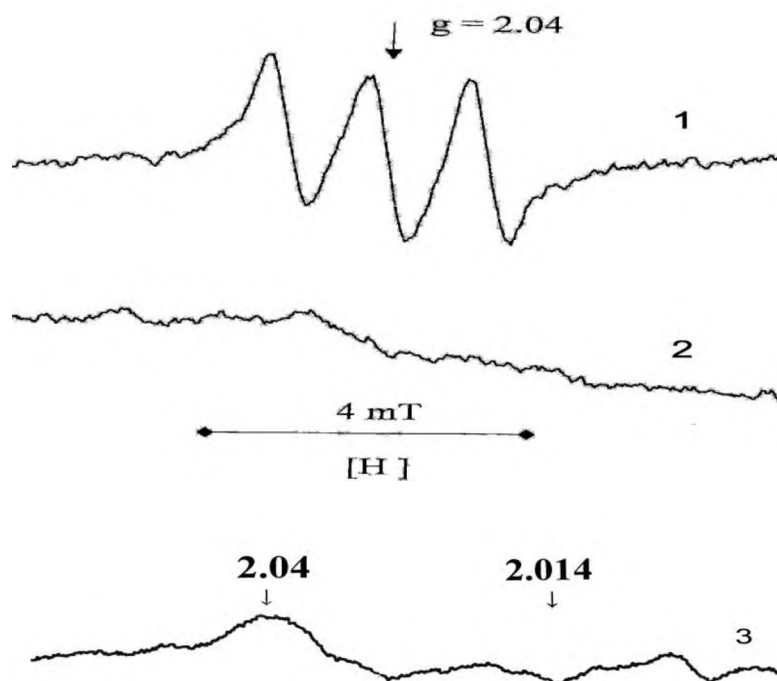


Рисунок 1 - Спектры ЭПР комплекса N-метил-D, L-глюкаминдителиокарбамата (МГД) с железом (2+) и оксидом азота МНКЖ МГД FeNO и М-ДНКЖ с глутатионом. Спектры 1 и 2 МНКЖ МГД FeNO 18 мкМ -триазавирин с глутатионом и без него соответственно, спектр 3 -М-ДНКЖ 8 мкМ на белке 20С

Условия записи спектров: X-диапазон, центр поля 334 мТ, развертка 10 мТ, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20мВт. Усиление 1×10^5 , 1накопление, температура 293К ,77К.

При проведении комплексного бактериологического исследования использовали передний и средний отделы кишечника пчел, было определено общее микробное число и видовой состав микрофлоры. Пчел каждой группы № 1- контроль, № 2-Триазавирин, № 3- Б-ДНКЖ вскрывали с использованием отдельных стерильных инструментов. Пробы кишечника извлекали, объединяли и приготавливали суспензии. Полученные суспензии подвергали последовательным десятикратным разведениям от 10^2 до 10^6 , после чего проводили высевы каждого разведения на твердые питательные среды с распределением суспензии по всей поверхности чашки. Засеянные чашки Петри выдерживали 30 мин на столе для впитывания материала, после чего помещали в термостат при температуре 37 °С. Учет результатов проводили через 24 и 48 ч., при этом подсчитывали выросшие колонии культур микроорганизмов и отбор колонии для видовой идентификации методом масс-спектрометрии (Maldi-Tof) согласно «Методическим указаниям по идентификации микроорганизмов с применением масс-спектрометра MALDI Biotyper при исследовании продовольственного сырья и пищевых продуктов» (одобрены НТС Россельхознадзора от 03.04.2014 г.). Посевы проводили на трёх средах (Кровяной агар Blood Agar Base+5% стерильная дефибринированная кровь, Агар MRS, Агар Мюллера-Хинтона).

В таблице 1 представлены результаты исследования пчел первой партии (1 неделя).

Таблица 1 - Микрофлора переднего и среднего отдела кишечника пчелы

п/п	Наименование материала	Результаты исследования 1 неделя	Результаты исследования 3 недели
1	Кишечник пчёл	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Escherichia coli</i>
2	Кишечник пчёл	<i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Leclercia adecarboxylata</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Aerococcus viridans</i>
3	Кишечник пчёл	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Rautella ornithinolytica</i> <i>Aerococcus viridans</i>

В таблице 2 представлены численные данные определения бактериальной обсеменности.

Таблица 2 - Численные данные роста бактерий 1 неделя

п/п		Степень разведения		Результат, микр. кл.
		10*1	10*5	
		Наименование среды		
		Кровяной агар (Blood Agar Base+5% стерильная дефибринированная кровь)		
1		>300	34±6	1504±250
2		>300	118±9	238±36
3		>300	>300	1500±230
1		>300	52±5	174±25
2		>300	25±4	877±124
3		>300	>300	1530±240
1		>300	37±4	766±134
2		>300	61±6	983±148
3		>300	83±7	896±139

На кровяном агаре в пробе №2 с триазавирином после разбавления до 10*5 остались, по-видимому, *Leclercia adecarboxylata*, *Aeromonas hydrophila*- 238±26 микр. кл., потому как в контроле *Klebsiella aerogenes*- 1504 микр. больше в 6 раз. На агаре MRS после разбавления до 10*5 по анализу количества микробных клеток можно предполагать, по тому как снижается количество *Klebsiella aerogenes*- 174±25 микр клеток, из 877±124 микр клеток большая доля принадлежит *Leclercia adecarboxylata* и *Aeromonas hydrophila*. Дальнейший анализ количества микробных клеток после разбавления до 10*5 выросших на агаре Мюллера-Хинтона свидетельствует о приблизительно равной доле *Klebsiella aerogenes*, *Leclercia adecarboxylata*, *Aeromonas hydrophila*.

О чем говорят эти данные? Наиболее чувствительной к действию триазавирина оказалась *Klebsiella aerogenes*, а к антимикробному действию ДНКЖ и *Klebsiella aerogenes* и *Aeromonas hydrophila*. 896±139 микр клеток принадлежат в

основном *Lecrecria adecarboxylata*, которая за 1 неделю приспособилась при поступлении меда с Б-ДНКЖ и продемонстрировала рост на средах.

В таблице 1 представлены результаты исследования микробиома кишечника пчел спустя 21 день после начала кормления.

На кровяном агаре в контроле при разведении 10^3 наблюдали 10 ± 3 колонии и 321 ± 48 микр. клеток.

В опыте с триазавирином в меде на кровяном агаре при разведении 10^4 наблюдали 10 ± 2 колоний и 4930 ± 780 микр.клеток, на Агаре MRS при разведении 10^6 21 колонию и 1470 ± 280 микр.клеток. При посеве на Агар Мюллера-Хинтона при разведении 10^7 обнаружено 128 ± 14 колоний 12900 ± 2100 микр.клеток.

На кровяном агаре в опыте с Б-ДНКЖ при разведении 10^9 наблюдали 4 ± 2 колонии и 11180 ± 1780 микр.клеток, на Агаре MRS при разведении 10^6 зарегистрировали 5 ± 2 колони и 1320 ± 190 микр.клеток. При посеве на Агар Мюллера-Хинтона при разведении 10^8 обнаружено 4 ± 2 колонии 4950 ± 780 микр.клеток.

Представленные результаты не претендует на полноту оценки микробиома пчел, для этого на следующем этапе работ необходим метагеномный анализ. При постановке данного исследования ставилась цель оценить влияние доноров оксида азота в предположении, что в организме пчел имеются микроорганизмы, уровень которых будет изменяться в ту или иную сторону. По результатам исследования наблюдается смена одних микроорганизмов другими в процессе активирования обменных процессов у пчел в течении трех недель. Исходно, что следует из бактериологического анализа, в кишечнике содержались следующие микроорганизмы:

Klebsiella aerogenes
Leclercia adecarboxylata
Aeromonas hydrophila
Pseudomonas fluorescens
Escherichia coli
Enterobacter aerogenes
Rautella ornithinilytica
Aerococcus viridans.

В контроле *Klebsiella aerogenes*-обнаружена спустя 1 неделю от начала кормления в контроле, а потом замещается через три недели *Pseudomonas fluorescens* и *Escherichia coli*.

С триазавирином-через неделю на средах наблюдается рост *Klebsiella aerogenes* *Leclercia adecarboxylata* *Aeromonas hydrophila*, а при кормлении с Б-ДНКЖ - только *Lecrecria adecarboxylata*. Спустя три недели кормления медом с триазавирином снова вытеснение или подавление роста в кишечнике пчелы-на средах растут *Enterobacter aerogenes*, *Aerococcus viridans*, а с ДНКЖ растут *Rautella ornithinilytica*, *Aerococcus viridans*.

Klebsiella aerogenes- первая неделя опыта и *Pseudomonas fluorescens* *Escherichia coli*- в конце опыта, не обнаруживаются в опыте с триазавирином и Б-ДНКЖ, что следует рассматривать, как имеющих высокую чувствительность к препаратам. К 21 дню *Enterobacter aerogenes* *Aerococcus viridans* -сохраняются в кишечнике в случае с триазавирином в корме и их рост обнаружен при посеве. И, таким образом, следует считать *Lecrecria adecarboxylata*, *Rautella ornithinilytica*, *Aerococcus viridans* наиболее устойчивыми к действию Б-ДНКЖ.

Механизм бактерицидного действия препаратов обусловлен модуляцией активности металлсодержащих белков: образованием на белках высокомолекулярных динитрозильных комплексов с тиоловыми лигандами [12,13], а также нитрозильных комплексов с металлами активных центров ферментов.

Заключение. Триазавирин и Б-ДНКД оказывают бактерицидное действие на микробиом зимующей пчелы.

Литература. 1. Lemaitre, B. The host defense of *Drosophila melanogaster* / B. Lemaitre, J. Hoffmann // *Annu Rev Immunol.* - 2007. - № 25. - P. 697–743. 2. Rivero, A. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates / A. Rivero // *Trends Parasitol.* - 2006. - № 22. - P. 219–225. 3. Greiner, T. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis / T. Greiner, F. Bäckhed // *Trends Endocrinol. Metab.* - 2011. - № 22. - P. 117–123. 4. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective / J. G. Le Blanc, C. de Giori Milani [et al.] // *Curr. Opin. Biotechnol.* - 2013. - № 24. - P. 160–168. 5. Rebuilding the gut microbiota ecosystem / A. Gagliardi [et al.] // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* - 2018. - № 15. - P. 1679. 6. Microbiota and metabolic diseases / A. Pascale [et al.] // *Endocrine.* - 2018. - № 61. - P. 357–371. 7. Molloy, M.J. Intestinal microbiota: Shaping local and systemic immune responses / M. J. Molloy,; Bouladoux, N.; Belkaid, Y. *Semin. Immunol.* 2012, 24, 58–66. 8. Octopamine and 5-hydroxytryptamine mediate hemocytic phagocytosis and nodule formation via eicosanoids in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* / G. S. Kim, M. Nalini, D. W. Lee, Y. Kim // *Arch Insect Biochem Physiol.* - 2009. - № 70. - P. 162–176. 9. De Grandi-Hoffman, G. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees / G. De Grandi-Hoffman, Y. Chen // *Curr. Opin. Insect Sci.* - 2015. - № 10. - P. 170–176. 10. Epoxide hydrolase activities and epoxy fatty acids in the mosquito *Culex quinquefasciatus* / J. Xu [et al.] // *Insect Biochem Mol Biol.* - 2015. - № 59. - P. 41–49. 11. Ingestion of the epoxide hydrolase inhibitor AUDA modulates immune responses of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* during blood feeding / J. Xu [et al.] // *Insect Biochem Mol Biol.* - 2016. - № 76. - P. 62–69. 12. Ванин, А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами / А. Ф. Ванин. – Москва-Ижевск : Институт компьютерных исследований, 2015. – 220 с. 13. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands / A. F. Vanin [et al.] // *Nitric Oxide Biol. Chem.* - 1998. - № 2. - P. 224-234. 14. On the nature of a compound formed from dinitrosyl iron complexes with cysteine and responsible for long-lasting vasorelaxation / V. P. Mokh, A. A. Poltorakov, V. A. Serezhenkov, A. F. Vanin // *Nitric Oxide Biol. Chem.* - 2010. - № 22. - P. 266-274. 15. Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione / A. F. Vanin, V. P. Mokh, V. A. Serezhenkov, E. I. Chazov // *Nitric Oxide Biol. Chem.* - 2007. - № 16. - P. 322-330. 16. Dinitrosyl iron complexes with thiol ligands promote skin wound healing in animals / A. B. Shekhter, T. G. Rudenko, V. A. Serezhenkov, A. F. Vanin // *Biophysics.* - 2007. - V. 52. - P. 5-12. 17. Триазавирин -противовирусный препарат нового поколения / Под редакцией академика РАН О. Н. Чупахина и академика РАН О. И. Киселева. – Екатеринбург, 2016. - 255 с.

УДК 619:615.3:576.89

АВЕРМЕКТИНЫ В СИСТЕМЕ МЕР БОРЬБЫ С ПАРАЗИТОЗАМИ ЖИВОТНЫХ

Скуловец М.В.

Пинский филиал УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Пинск, Республика Беларусь

Введение. Паразитарные болезни животных широко распространены в большинстве регионов мира и наносят огромный экономический ущерб. Особые природно-климатические условия Республики Беларусь способствуют также широкому распространению паразитарных болезней. Начиная с 50-х годов XX века в Республике Беларусь, были проведены важные и всесторонние исследования по изучению паразит фауны диких и домашних животных, циклов их развития, вызываемых ими болезней и разработке эффективных средств терапии и профилактики. Проблема ликвидации паразитов не решена по ряду причин, из