Роль антимикробного пептида дефенсина в иммунитете пчелиной семьи

Важные составляющие иммунитета пчелиной семьи — антимикробные пептиды (АМП) (Hoffmann et al., 1999). Они активируются и доставляются к месту инфицирования в организме пчелы за короткий промежуток времени (Aerts et al., 2008). Многие проблемы пчеловодства можно решить через активацию иммунитета пчелиной семьи увеличением уровня экспрессии АМП у отдельных особей [5].

На данный момент у медоносной пчелы обнаружено четыре вида АМП: апидацин (apidaecin) (Casteels et al., 1989), абацин (abaecin) (Casteels et al., 1990), гименоптецин (hymenoptaecin) (Casteels et al., 1993) и дефенсин (defensin). Последние — одни из важнейших компонентов противoinфекционной защиты, представляют собой большое семейство цистеин-богатых АМП [2]. Они — гомологи формицинов мухи *Phormia terranovaе* и отличаются от других пептидов своеобразной структурой, а также избирательной активностью по отношению к грамположительным бактериям и некоторым мицелиальным грибам (Klaudiny et al., 1994; Черныш, Гордя, Филатова, 1999).

Дефенсины медоносной пчелы — дефенсин 1 и дефенсин 2 с молекулярным весом 5,5 и 4,8 кДа соответственно — кодируются генами *defensin 1* и *defensin 2*. Дефенсин 1 представлен тремя изоформами: дефенсином гемолимфы, дефенсином маточного молочка (роялизином), имеющего изоформы Ro-F (Fujiwara et al., 1990) и Ro-K (Klaudiny et al., 2005) с молекулярной массой 5525,1 и 5515,5 Да соответственно. Роялизин отличается от дефенсина гемолимфы пчелы двумя аминокислотными заменами [6].

Большинство АМП при инфекциях и повреждениях покровов продуцируют клетки жирового тела (адипоциты) и гемолимфы (гемоциты), выделяя их в плазму гемолимфы (Hoffmann et al., 1999; Choi et al.,

2008). Доля АМП, синтезируемых гемоцитами, незначительна. Основную часть защитных пептидов продуцируют адипоциты (Hoffmann, Richhart, 1997). Вместе с тем методом RT-PCR (полимеразная цепная реакция в режиме реального времени) было показано, что дефенсин 1 экспрессируется в голове и тораксе пчелы гипофаренгиальными, мандибулярными и торакальными железами (Lopez et al., 2003; Klaudiny et al., 2005) и выделяется в маточное молочко (Qu et al., 2008) и мед (Kwakman et al., 2010). Таким образом, можно сделать вывод о преимущественной роли дефенсина 1 в формировании социального иммунитета пчелиной семьи в отличие от дефенсина 2, вырабатываемого адипоцитами и гемоцитами и являющегося компонентом индивидуального иммунитета. Низкий уровень транскрипции в норме и присутствие регуляторных элементов в промоторном регионе гена дефенсина 2 доказывают, что пептид индуцируется патогенным фактором (Casteels et al., 1993; Klaudiny et al., 2005). Широкое присутствие дефенсинов в организме медоносной пчелы свидетельствует о его универсальных и значимых функциях в индивидуальном и социальном иммунитете [2].

Широкая вариабельность количества и уровня активности дефенсинов в маточном молочке у разных здоровых семей медоносной пчелы, вероятно, связана, в частности, с генетической вариабельностью уровней экспрессии дефенсинов.

Инициация транскрипционной активности генов АМП происходит при ранении и попадании в гемолимфу различных по природе и происхождению иммунных индукторов — бактерий, грибов, фрагментов пептидогликанов и липополисахаридов клеточных стенок бактерий (Dunn, 1990), некоторых инсектицидов (Zhu, Lu, 1992), олигомеров хитина (Furukawa et al., 1999; Салтыкова с соавт., 2010). Активация синтеза АМП в

адипоцитах и гемоцитах осуществляется несколькими механизмами. Предполагается, что в генерации индукторов синтеза АМП — липополисахаридов, пептидогликанов и β -1,3-гликанов — участвуют фагоциты, выделяющие в гемолимфу компоненты клеточных стенок поглощенных и переваренных бактерий (Taniani, Wago, Yamakawa, 1997). Деятельность адипоцитов и гемоцитов усиливают гемоцитарные медиаторы, в роли которых могут выступать простагландины (Stanley-Samuelson, 1994). Показано, что фагоциты с поглощенными микроорганизмами способны непосредственно прикрепляться к клеткам жирового тела, что также стимулирует синтез АМП (Faye, Wyatt, 1980). Кроме того, предполагается активация синтеза АМП в адипоцитах и гемоцитах под действием медиаторов эндокринной системы [1].

У насекомых существует два основных NF- κ B-опосредованных (nuclear factor kappa B) сигнальных пути: Imd-путь (Imd-immune deficiency signaling pathways) и Toll-путь (Toll-like receptor signaling pathways), — контролирующие экспрессию генов АМП (Глулов, 2001; Osta с соавт., 2004). Toll-путь отвечает за защиту от грибов и грамположительных бактерий, тогда как Imd-путь обеспечивает в основном защиту от грамотрицательных бактерий (Evans, Spivak, 2010). Вместе с тем контроль экспрессии генов дефенсинов осуществляется взаимодействием этих двух путей (Aronstein, Murray, Saldivar, 2010), что свидетельствует о важности данного элемента системы АМП. АМП активны при низкой концентрации и показывают широкий спектр активности, взаимодействуя с мембранами клеточных стенок патогенов и действуя совместно с другими агентами иммунного ответа (Osta et al., 2004).

Дефенсины проявляют цитотоксическую активность по отношению к грамположительным бактериям (Casteels-Josson с соавт., 1994; Bulet, Stocklin, 2005) и нескольким видам грамотрицательных (Arbia, Babbay, 2011). Механизм их действия сводится к нарушению целостности и проницаемости цитоплазматической мембраны клеток патогенных организмов [2]. Р. Н. S. Kwakman с соавт. (2010) показали антимикробные свойства меда, который в 10%-ном разведении убивает таких опасных возбудителей, как *Bacillus subtilis*, резистентных к метициллину *Staphylococcus aureus*, β -лактамазопродуцирующих *Escherichia coli*, ципрофлоксацин-резистентных *Pseudomonas aeruginosa* и ванкомицин-резистент-

ных *Enterococcus faecium*. Было показано, что антимикробные свойства меда обеспечивают присутствующие в нем перекись водорода, метилглиоксаль и антимикробный пептид дефенсин 1.

Один из факторов социального иммунитета пчелиной семьи — роялизин маточного молочка, защищающий личинок от бактерий. Было показано, что этот АМП в основном эффективен против грамотрицательных бактерий и частично против грамположительных [6]: отмечена его активность против американского гнильца *P. I. larvae* (Bilikova, Gusui, Simuth, 2001; Vachanova с соавт., 2002; Yoshiyama, Kimura, 2010).

Непатогенные для пчелы бактерии *Lactobacillus* стимулируют увеличение уровня экспрессии генов абецина и дефенсинов, что обуславливает возможность их использования в качестве пробиотиков для усиления иммунитета пчелиной семьи (Arbia, Babbay, 2011). Это касается и хитозанов, которые, имитируя вторжение микроорганизмов, инициируют экспрессию генов дефенсинов [3].

Дефенсины медоносной пчелы обладают цитотоксической активностью против мицелиальных грибов и дрожжей — возбудителей известкового расплода (*Ascospaera apis*), аспергиллеза (*Aspergillus flavus* Link и *Aspergillus niger* Tieghem), дрожжеподобных грибов *Candida albicans* и *Aurobasidium pullulans* (Черныш, Гордя, Филатова, 1999; Aronstein, Murray, Saldivar, 2010). В частности, К. А. Aronstein, Е. Saldivar (2005) показали рост профиля уровня экспрессии дефенсинов в пятидневных личинках *Apis mellifera*, экспериментально инфицированных *Ascospaera apis* [2].

Известно увеличение уровня экспрессии генов дефенсинов в организме медоносной пчелы при паразитировании в ней микроспоридии *Nosema apis* и уменьшение — при поражении ее *Nosema ceranae* (Antunez et al., 2009). Вероятно, это следствие длительной коэволюции *A. mellifera* с *N. apis*, определившей возникновение специфических иммунных механизмов у хозяина к данному паразиту. А *N. ceranae* как новый паразит для медоносной пчелы вызывает более серьезные нарушения в кишечнике, подавляет иммунитет в целом и экспрессию дефенсинов в частности (Klee et al., 2007).

Паразитический клещ *Varroa destructor* отрицательно влияет на гуморальный иммунитет пчел, снижая уровень транскрипции генов дефенсинов (Yang et al., 2004; Gregory et al.,

2005). Возможно, что *V. destructor* вызывает иммуносупрессию пчел посредством репликации вируса деформации крыла DWV, переносчиком которого он является (Genersch, Aubert, 2010).

Данная работа может быть полезна для практического пчеловодства, а также в селекции семей, устойчивых к микробным патогенам. Так, отбор пчелиных семей с наиболее ярко выраженными антимикробными свойствами меда позволит в дальнейшем получить линии с высоким уровнем иммунитета и экспрессии антимикробных пептидов. Представления о механизмах социального иммунитета на уровне пчелиной семьи и индивидуального иммунитета на уровне отдельной особи позволят пчеловоду грамотно проводить мероприятия профилактики и лечения на пасеке. Использование индукторов экспрессии антимикробных пептидов, например пробиотик, и препаратов хитозана позволит усилить иммунитет пчелиной семьи без использования лекарств и антибиотиков.

**Р.А.ИЛЬЯСОВ, Л.Р.ГАЙФУЛЛИНА,
Е.С.САЛТЫКОВА, А.В.ПОСКРЯКОВ,
А.Г.НИКОЛЕНКО**

*Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН
e-mail: apismell@hotmail.com*

Дефенсины индуцибельны, контролируются взаимодействием Toll- и Imd-сигнальных путей и обладают

широким спектром антимикробного действия. Они существуют в виде двух пептидов — дефенсин 1 и 2. Первый синтезируется в слюнных железах и участвует в формировании общественного иммунитета, тогда как второй синтезируется клетками жирового тела и гемолимфы, являясь фактором индивидуального иммунитета медоносной пчелы.

Ключевые слова: *дефенсины пчел, иммунитет пчелиной семьи, известковый расплод, Varroa destructor.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Глузов В.В. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. — М., 2001.
2. Ильясов Р.А., Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Дефенсины в противоиной защите медоносной пчелы // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2012. — Т. 48. — №5.
3. Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Действие хитозана на индукцию основных антибактериальных пептидов у медоносной пчелы // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы десятой международной конференции. — Нижний Новгород. — 2010.
4. Aronstein K.A., Saldivar E. Characterization of a honeybee Toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense // Apidologie. — 2005. — V. 36.
5. Bilikova K., Gusui W., Simuth J. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifouling factor // Apidologie. — 2001. — V. 32.
6. Klaudivny J., Albert S., Bachanova K., Kopernicky J., Simuth J. Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera* // Insect Biochemistry and Molecular Biology. — 2005. — V. 35.