Ю.В. Лопатина^{1,2}, О.Ю. Еремина²
Yu.V. Lopatina^{1,2}, O.Yu. Eremina²

МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЧЛЕНИСТОНОГИХ К ПЕСТИЦИДАМ: СНИЖЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ КУТИКУЛЫ И РОЛЬ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ

MECHANISMS OF INSECTICIDE RESISTANCE IN ARTHROPODS: REDUCED CUTICLE PENETRATION AND ABC TRANSPORTERS

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия,

²ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

Проанализированы данные литературы, посвященные роли кутикулы и АТФ-связывающих кассетных транспортеров (АВС-транспортеров) в формировании резистентности членистоногих к инсектицидам. У резистентных к инсектицидам насекомых и клещей выявлено увеличение содержания насыщенных жирных кислот в эпикутикуле, утолщение кутикулы. Для ряда видов насекомых установлены молекулярные механизмы, определяющие снижение проницаемости кутикулы для инсектицидов. У резистентных к фенвалерату комаров *Culex pipiens pallens* выявлена сверхэкспрессия гена *CpLac2*, кодирующего фермент лактазу, участвующего в склеротизации кутикулы, что приводит к армированию кутикулы и снижает проникновение инсектицида. Использование специфических ингибиторов АВС-транспортеров (верапамила, хинидина и пр.) в экспериментах на членистоногих и культурах клеток клещей позволяет косвенным токсикологическим методом показать вовлеченность АВС-транспортеров в механизмы резистентности у многих видов насекомых и клещей. Увеличенная экспрессия генов, кодирующих АВС-транспортеры, обнаружена у членистоногих, резистентных к разным группам инсектицидов.

The literature data on two mechanisms of insecticide resistance in arthropods (reduced cuticle penetration and increased activity of ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) were analyzed. Common mechanisms are increasing of saturated fatty acids mass content in the epicuticle of insects, thickening of the cuticle. Molecular mechanisms for reduced cuticular penetration as a contributor to insecticide resistance have been established for some species of insects. It is assumed that resistance can derive from reinforce the cuticular due to overexpression of the *CpLac2* gene, encoding the laccase enzyme, which is involved in the cuticle sclerotization. The use of specific inhibitors of ABC-transporters (verapamil, quinidine, etc.) in experiments on arthropods and tick cell cultures allows showing the involvement of ABC-transporters in the mechanisms of resistance in many species of arthropods by indirect toxicological methods. Increased expression of genes encoding ABC-transporters was found in arthropods resistant to different groups of insecticides.

Проблема резистентности к инсектицидам членистоногих, имеющих медицинское, ветеринарное или сельскохозяйственное значение приобрела в настоящее время глобальный характер [50]. В связи с этим изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе устойчивости насекомых и клещей к ксенобиотикам, является одним из основных направлений исследований в области медицинской и ветеринарной энтомологии [44]. Резистентность, возникающая под прессом пестицидов, может формироваться за счет разных механизмов, причем в разных популяциях одного вида членистоногих эти механизмы могут встречаться в различных сочетаниях [25, 34, 60]. Один из основных и наиболее хорошо изученных способов адаптации насекомых и клещей к действию пестицидов - снижение чувствительности мишени (места действия) инсектицида [49]. Второй механизм, не менее важный и часто встречающийся у многих групп членистоногих – изменение интенсивности процессов детоксикации ксенобиотиков за счет усиления активности трех основных систем ферментов – монооксигеназ, неспецифических эстераз и глутатион S-трансфераз. Кроме того, резистентность может формироваться за счет изменения поведения (пищевого поведения, выбора места обитания и пр.), позволяющего избегать воздействия пестицида [59]. Другими механизмами устойчивости, которым посвящен настоящий обзор, являются уменьшение проницаемости кутикулы для пестицидов и усиление активности АТФ-зависимых кассетных транспортных белков (Adenosine-triphosphate Binding Cassette), или ABC-транспортеров, у насекомых и клещей.

Проницаемости кутикулы для пестицидов. Кутикула насекомых служит первой линией защиты от инсектицидов [56]. Снижение скорости проникновения различных ксенобиотиков через покровы выявлено у многих видов резистентных к инсектицидам насекомых из разных таксономических групп. В частности это отмечено у представителей отряда чешуекрылых *Lepidoptera* - табачной совки *Heliothis virescens* Fabricius, хлопковой совки *Helicoverpa armigera* Hdn., американской кукурузной совки *Helicoverpa zea* (Boddie), совки малой *Spodoptera exigua* (Hubner) [2, 32, 38] и др.; отряда двукрылых *Diptera* - комнатной мухи *Musca domestica* L., дрозофилы *Drosophila melanogaster* Meigen, комаров *Aedes aegypti* L., *Culex pipiens* L. [39] и др.; отряда таракановых *Blattoptera* - рыжего таракана *Blattella germanica* L. [57], а также у других групп насекомых и клещей.

В некоторых случаях снижение проницаемости кутикулы для инсектицида оказывает само по себе незначительное влияние на уровень резистентности, но в сочетании с увеличением скорости процессов метаболизма, приводит к увеличению устойчивости в 5-10 раз по сравнению с уровнем, обусловленным исключительно усилением активности ферментных систем, участвующих в детоксикации ксенобиотиков. Эксперименты с инсектицидами, несущими изотопные метки, позволили точно охарактеризовать скорость их проникновения через кутикулу и показали снижение проницаемости покровов у резистентных видов насекомых [57].

Методы, используемые в исследованиях проницаемости кутикулы членистоногих для инсектицидов, разнообразны. Они включают в себя как простые с технической точки зрения методы, позволяющие установить наличие изменений в строении кутикулы у резистентных к пестицидам насекомых, так и более сложные молекулярно-генетические методы, выявляющие молекулярные механизмы, лежащие в основе этих изменений.

На резистентной к пиретроиду дельтаметрину культуре постельного клопа *Cimex lectularius* L., показано, что токсичность инсектицида увеличивается в 105 раз при инъекции в полость тела по сравнению с топикальным нанесением на покровы. Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли кутикулы в формировании резистентности [цит по: 25]. Для другого вида синатропных насекомых – рыжего таракана *B. germanica* показано, что для особей чувствительной и резистентной к пиретроидам (перметрин - 97×, дельтамет- 480×) лабораторных линий токсичность перметрина и дельтаметрина при инъекции и топикальном нанесении на покровы практически не различалась. Полученные результаты свидетельствуют о том, что проницаемость кутикулы для пиретроидов снижена у устойчивых к ним насекомых незначительно, и ведущими являются другие механизмы резистентности [54].

Вместе с тем изменение скорости проникновения пестицидов у резистентных членистоногих не является обязательным механизмом и развивается не во всех случаях. Так, при сравнении инсектицидной активности фипронила при инъекции и топикальном нанесении на *B. germanica* чувствительной расы JWax-S и резистентной GNV-R (показатель резистентности (ПР) — 36) различий не выявлено [19].

Изменение химического состава кутикулы. В 70-х гг. прошлого века было высказано предположение, что устойчивость насекомых к инсектицидам связана с составом кутикулы. Установлено, что в эпикутикуле комнатной мухи *M. domestica* из высокорезистентной к кумафосу линии содержится больше насыщенных жирных кислот в сравнении с мухами лабораторной чувствительной к инсектицидам культуры. При смывании хлороформом слоев эпикутикулы у резистентных к хлорофосу комнатных мух проницаемость покровов для инсектицида увеличилась. Проницаемость кутикулы для фосфорорганических соединений (ФОС) у резистентной к этой группе инсектицидов комнатной мухи *M. domestica* положительно коррелировала с полярностью инсектицида [1]. Сопоставимые данные были получены и для двух видов совков рода *Heliothis* — табачной совки *H. virescens* и хлопковой совки *H. armigera*: у устойчивых к ФОС особей кутикула содержала на 60% больше липидов, чем у чувствительных насекомых, что приводило к уменьшению скорости проникновению инсектицидов этой группы в 1,7-5,0 раз. Эти исследования позволили предположить, что снижение проницаемости для инсектицидов кутикулы насекомых связано с увеличением содержания в ней липидов, расположенных главным образом в восточном слое эпикутикулы [20].

Увеличение толщины кутикулы. О. Вуд с соавторами [56] методом электронной микроскопии показали, что толщина кутикулы у комара *Anopheles funestus* Giles положительно коррелирует с резистентностью к перметрину, и является дополнительным механизмом устойчивости, сочетающимся с увеличением активности микросомальных монооксигеназ. Авторы предположили, что утолщенная кутикула на конечностях может замедлить проникновение инсектицида и за счет этого ослабить его действие. Сходные данные были получены и для постельного клопа *C. lectularius*: в опытах с чувствительными и устойчивыми к пиретроидам особями показано, что устойчивость положительно коррелирует с толщиной кутикулы [30]. Значительное увеличение толщины кутикулы выявлено и у триатомового клопа *Triatoma infestans* Klug из резистентной к пиретроидам популяции [40].

Основными компонентами кутикулы, определяющими ее физические свойства, являются кутикулярные белки (cuticular proteins, CPs), составляющие от четверти до половины сухого материала кутикулы членистоногих. Полногеномное секвенирование ряда видов насекомых позволило идентифицировать большое число генов, кодирующих эти белки. В настоящее время описано более тысячи кутикулярных белков насекомых, входящих в 13 семейств [55]. В частности, у малярийного комара *Anopheles gambiae* Giles и тутового шелкопряда *Bombyx mori* (L.) выявлено более 200 кутикулярных белков, относящихся к нескольким семействам [17, 55], у мухи *D. melanogaster* — 101 кутикулярный белок только из семейства CPR, включающего в себя R&R белки, содержащие хитин-связывающий домен — консервативную область, известную как консенсус Реберса-Риддифорда.

У резистентных насекомых экспрессия генов, кодирующих кутикулярные белки, увеличивается. Так, для устойчивой к ДДТ расы 91-R мух *D. melanogaster* показана увеличенная экспрессия генов *cpr72Ec* и *Lcp-1*, кодирующих R&R белки [46]. Постоянное воздействие в течение суток эндосульфана из группы хлорорганических соединений на личинку третьего возраста *D. melanogaster* вызывало дифференциальную экспрессию 256 различных генов, в том числе и нескольких генов *cpr*. Интересно, что в их число входит *Lcp-1*, но не включен *cpr72Ec* [48].

Исследования белков кутикулы проведены у малярийных комаров, устойчивых к инсектицидам. В частности, у резистентных к пиретроидам *Anopheles stephensi* Liston показана сверхэкспрессия гена *CPLC8*. Функция белка, кодируемого *CPLC8*, не известна, однако этот ген сходен с геном *CG7216* взрослых особей *Drosophila*, кодирующим предшественник кутикулярного белка (cuticle protein 1 precursor, *DACP1*) [53].

У резистентных постельных клопов *C. lectularius* снижение проницаемости покровов обусловлено индуцированной экспрессией генов, кодирующих белки кутикулы. У клопов из резистентной к дельтаметрину популяции постельного клопа выявлены 62 кутикулярных белка из семейства CPR, содержащих консенсусную последовательность R&R и предположительно вовлечённых в механизм резистентности. Методом количественной ПЦР показано, что количество многих транскриптов у резистентных особей было увеличено более чем в 20 раз по сравнению с чувствительными. Полученные результаты позволили предположить, что специфические белки, присутствующие в кутикуле, определяют ее проницаемость для инсектицидов [25]. Остается неясным – сопровождается ли увеличение количества этих белков пропорциональным увеличением количества хитина или же его количество остается тем же, но плотность связанных с белком хитиновых пластинок - ламелл становится выше.

Методом двухфакторного анализа GLMseq были выявлены гены, которые в различной степени экспрессируются у устойчивых и чувствительных к инсектицидам особей *C. lectularius*. У резистентных клопов из 247 генов кутикулярных белков для 46 наблюдается увеличение экспрессии и только для 8 – уменьшение количества транскриптов. Это сочетается с другим механизмом резистентности – усилением активности цитохромов P450 [34]. В другом исследовании резистентных к пиретроиду дельтаметрину популяций *C. lectularius* были идентифицированы 12 молекулярных маркеров этой резистентности, в том числе гены, отвечающие за кутикулярные белки (C2, C10 и C13). У резистентных к дельтаметрину клопов экспрессия этих генов была выше в голове, конечностях и покровах, по сравнению с внутренними органами и тканями [60].

Анализ изменений в экспрессии генов у резистентных к пиретроиду комаров *An. gambiae* выявил пять сверхэкспрессированных генов, в том числе *Cplc8* и *Cplc4*, по сравнению с чувствительными особями [5]. В дальнейшем было высказано предположение, что белки CPLCG3 и CPLCG4, находящиеся в эндокутикуле *An. gambiae*, связаны с увеличением толщины кутикулы и резистентностью к инсектицидам, тогда как белок CPF3 – с устойчивостью насекомых к высыханию. Наличие CPLCG3 и CPLCG4 в конечностях комаров объясняют тем, что именно конечности больше всего контактируют с обработанной инсектицидами поверхностью [52]. Анализ транскриптома комаров *An. stephensi* из резистентной к пиретроиду популяции также выявил увеличение экспрессии кутикулярных белков CPLCG3 (ранее называемых CPCL8), которые, как считается, определяют увеличение толщины кутикулы [53].

У комаров *An. gambiae* экспрессия генов цитохрома P450, связанная с резистентностью к пиретроиду дельтаметрину, катализирует продукцию кутикулярных белков, что приводит к утолщению плотного эпикутicularного слоя и увеличению в кутикуле количества углеводородных соединений на 29% [6].

Другой механизм резистентности, связанный с проницаемостью кутикулы для инсектицидов, продемонстрирован на примере комаров *Culex pipiens pallens*, устойчивых к пиретроиду фенвалерату. У этого вида обнаружена сверхэкспрессия гена *CrLac2*, кодирующего фермент лакказы, участвующий в склеротизации кутикулы и детоксикации ксенобиотиков. Исследования методом количественной ПЦР в режиме реального времени показали значительно более высокие уровни транскрипции гена *CrLac2* у устойчивых к фенвалерату комаров по сравнению с чувствительными особями. Предположено, что снижение проницаемости происходит вследствие армирования кутикулы, что задерживает проникновение инсектицида в клетки нервной системы [39].

Усиление активности АВС-транспортёров.

Увеличение экскреции инсектицидов является признанным механизмом резистентности членистоногих. Известно, что ксенобиотики активно выводятся из клеток с помощью трансмембранных белков, известных как АТФ-связывающие кассетные АВС-транспортёры. Они образуют одно из крупнейших суперсемейств белков мембраны и присутствуют у всех организмов от бактерий до человека [13, 14]. Используя энергию, освобождающуюся при гидролизе аденозинтрифосфата в аденозиндифосфат, АВС-транспортёры переносят через биологические мембраны широкий спектр субстратов, в том числе ксенобиотики и химиотерапевтические препараты, часто против градиента концентраций [36]. Р-гликопротеин (АТФ-зависимый транспортный

белок с низкой субстратной специфичностью) уже признан в качестве основной причины лекарственной устойчивости в человеческой химиотерапии рака. Некоторые ABC-транспортёры, в частности из подсемейств ABCB (MDR, Multi-Drug Resistance), ABCC (MRP, multidrug-resistance associated proteins) и подсемейства ABCG отвечают, по-видимому, за выполнение многочисленных химических взаимодействий у насекомых. Они имеют широкую субстратную специфичность, в том числе к пестицидам [15, 36]. У насекомых их бывает сложно разделить, поэтому в публикациях они нередко фигурируют как «MDR transporters». ABC-транспортёры приобретают большое значение на третьей фазе метаболизма ксенобиотиков, усиленно выводя токсины из клетки. Избыточная экспрессия и локализация р-гликопротеина (АТФ-связывающего ABC-транспортёра ABC-B-типа) в кутикуле резистентных насекомых приводит к снижению проницаемости кутикулы для инсектицида. Усиление активности ABC-транспортёров у устойчивых к инсектицидам членистоногих указывает на их вклад в механизм резистентности [27].

Вопрос о роли ABC-транспортёров в формировании резистентности членистоногих к биоцидам был поднят относительно недавно – интенсивные работы в этой области были начаты в 2000-х гг. и активно продолжаются в настоящее время. Основные исследования были проведены на устойчивых к инсектицидам насекомых из отрядов Hemiptera, Blattoptera, Lepidoptera, Diptera, а также на клещах из отрядов Trombidiformes (Acariformes, Prostigmata) и Ixodida (Parasitiformes, Ixodidae).

Несмотря на то, что геномы более 60 видов членистоногих были полностью секвенированы, ABC-транспортёры были аннотированы и детально изучены только у нескольких видов насекомых и клещей. К ним относятся дрозофила *D. melanogaster*, комар *An. gambiae*, медоносная пчела *Apis mellifera* L., тутовый шелкопряд *B. mori*, малый булавовусый хрущак *Tribolium castaneum* (Herbst), человеческая вошь *Pediculus humanus* L., паутинный клещ *Tetranychus urticae* C. L. Koch [9, 15, 31, 58 и др.]. Число ABC-транспортёров сильно варьирует у различных видов насекомых и клещей. У *An.gambiae* выявлено 52 ABC-транспортёра, у *D. melanogaster* – 56. Сопоставимое число АТФ-зависимых транспортных белков зарегистрировано у *B. mori* – 55 и у *T. castaneum* – 73 [9, 31]. Наибольшее число ABC-транспортёров (103) выявлено у обыкновенного паутинного клеща *T. urticae*, что связывают с экспрессией генов ABCC, ABCG и ABCN, тогда как у *T. castaneum* – только ABCC и ABCN [9, 15]. Минимальное число транспортных белков этой группы (40) обнаружено у паразитического насекомого-гематофага – человеческой вши *P. humanus* [58].

Большое число работ посвящено исследованию АТФ-зависимых транспортёров классического модельного объекта – дрозофилы *D. melanogaster*. У этого вида обнаружены транспортёры ABC-B типа, в частности, р-гликопротеины, не имеющие субстратной специфичности и выводящие широкий спектр гидрофобных субстратов, в том числе инсектициды. Р-гликопротеины у *D. melanogaster* кодируют три гена - MDR49, MDR50 и MDR65. В дополнение к MDR-транспортёрам, *D. melanogaster* имеет также гены, кодирующие белки MRP (Multidrug resistance proteins), тесно связанные с р-гликопротеинами, но отнесенные к отдельному подсемейству ABCC [10, 51]. Белки MRP, по сравнению с Р-гликопротеинами, более активно транспортируют органические анионы, конъюгаты тяжелых металлов с глутатионом. Общий путь детоксикации ксенобиотиков – образование конъюгатов с глутатионом, поскольку они более гидрофильны и легче выводятся из клетки глутатион-транспортёрами — белками MRP. Многочисленные гены подсемейства ABCC обнаружены также у комара *An. gambiae* [47].

Большое число работ посвящено роли ABC-транспортёров в формировании устойчивости членистоногих к инсектицидам из группы макроциклических лактонов. Показано, что ивермектин связывается и перемещается транспортным белком мембраны Р-гликопротеином, транспортёрами из ABC-B и/или ABC-C семейств. Взаимодействие ABC-транспортёров и ивермектина впервые было отмечено, когда линия мышей, лишенных р-гликопротеинов (ABC-B) погибла после лечения от паразитов ивермектином [8]. Увеличенная экспрессия генов, кодирующих АТФ-зависимые транспортёры, способствует увеличению резистентности к ивермектину у паразитических нематод *Teladorsagia circumcincta* (Stadelman) и *Haemonchus contortus* (Rudolphi),

иксодовых клещей *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) и платяных вшей человека *P. h. humanus* [42, 58].

Повышенная производительность генов, кодирующих АВС-транспортёры, обнаружена у многих видов членистоногих: резистентных к перметрину комаров *An. stephensi* [16], резистентных к темефосу и дифлубензурону комаров *Aedes caspius* Pallas [45], резистентной к абамектину дрозифилы *D. melanogaster* [33], у мультирезистентной к инсектицидам совки *H. armigera* [4], у клеща *R. (B.) microplus*, устойчивого к ивермектину [42] и др. Так, например у резистентных к пиретроидам комаров *Ae. aegypti* (резистентность к перметрину 110 ×, дельтаметрину 30 ×) экспрессия гена AAEL006717 была в 7 раз выше по сравнению с чувствительными насекомыми [7]. Предполагается, что мутации гена ABCG2 определяют резистентность совков рода *Heliothis* к токсину Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* [18].

В значительной части исследований роль АВС-транспортёров в формировании у насекомых резистентности к инсектицидам оценивают с помощью косвенных токсикологических методов с использованием специфических ингибиторов – верапамила (фенилалкиламин), хинина (алкалоид хинного дерева), хинидина (d-изомер хинина), циклоспорина А (циклический полипептид), фумитреморгина С (индольный алкалоид) и ряда других веществ [21, 43].

Наиболее часто используют верапамил — блокатор кальциевых каналов L-типа, ингибирующий АВС-транспортёры как у позвоночных животных, так и у насекомых, и замедляющий трансмембранный перенос субстратов р-гликопротеинами через гематоэнцефалический барьер и через эпителий мальпигиевых сосудов [3]. Полученные в результате таких экспериментов результаты косвенно свидетельствуют о вкладе АВС-транспортёров в формирование резистентности. Хинидин увеличивал чувствительность к тиодикарбу резистентных популяций табачной совки *H. virescens* в 12,5 раз и всего в 1,8 раза - у чувствительных к нему особей. Методом ПЦР в режиме реального времени показано, что у резистентных к тиодикарбу гусениц *H. virescens* в шесть раз увеличено количество р-гликопротеинов по сравнению с чувствительными особями [28]. Использование верапамила и циклоспорина А повышало чувствительность личинок комаров-звонцов *Chironomus riparius* (Meigen) к ивермектину в 2,5 раза (по ЛД50) [41]. Верапамил также повышал чувствительность комаров *C. pipiens* к ивермектину в два раза, эндосульфана (ХОС) в 1,6 раза и пиретроиду циперметрину в 2,2 раза. При этом чувствительность личинок к хлорпирифосу не изменялась [11]. Скармливание медоносной пчеле сахарного сиропа, содержащего верапамил, значительно увеличивало чувствительность насекомых к двум акарицидам — пиретроиду флувалинату и кумафосу из группы ФОС [22, 23].

Предварительная обработка сублетальными дозами ингибиторов АВС-транспортёров (циклоспорина А и МК571) личинок *R. (B.) microplus* из популяции «Jaguар», мультирезистентной к ФОС, пиретроидам, амидинам (амитразу) и макроциклическим лактонам, приводила к значительному увеличению их чувствительности по отношению к инсектицидам ивермектину, абамектину, моксидектину (макроциклические лактоны) и хлорпирифосу (ФОС). При этом для личинок чувствительной к инсектицидам культуры подобного эффекта не выявлено. Чувствительность личинок иксодидов обеих линий к циперметрину и амитразу (по СК50) как подвергшихся воздействию ингибиторов, так и без ингибиторов, существенно не различалась [43]. У личинок иксодового клеща *Rhipicephalus sanguineus* s. l. предварительно обработанных сублетальной дозой циклоспорина А, увеличилась чувствительность к фипронилю в 14 раз и ивермектину в 22 раза, что указывает на участие АВС-транспортёров в детоксикации этих акарицидов [12]. Сравнение устойчивой и чувствительной к амитразу рас *R. (B.) microplus* показало, что у клещей резистентной расы детоксикация амитраза при обработке клещей циклоспорином А в сублетальных концентрациях была более эффективной по сравнению с лабораторной культурой, чувствительной к инсектицидам. Анализ профиля экспрессии генов АВС-транспортёров показал ее увеличение в 2,5 раза у резистентной к амитразу линии клещей по сравнению с чувствительной [29].

При изучении устойчивости к ивермектину чесоточного клеща *Sarcoptes scabiei* L. было высказано предположение, что механизм формирования у него резистентности также может быть

связан с р-гликопротеином. Были идентифицированы и частично секвенированы 9 АВС-транспортеров *S. scabiei*, относящиеся к подсемействам А, В, С, Е, F, Н. Эти результаты заложили основу для дальнейших исследований вклада АВС-транспортных белков в формирование резистентности *S. scabiei* к ивермектину [37].

В последнее время резко возросло число исследований функций отдельных генов, определяющих устойчивость к инсектоакарицидам, которые проводят на культурах клеток членистоногих. Серия работ, посвященных изучению роли АВС-транспортеров в формировании резистентности к ивермектину, проведена на культурах клеток иксодовых клещей. Так, на культуре клеток иксодового клеща *Ixodes ricinus* IRE/CTVM19 оценена экспрессия под воздействием ивермектина нескольких р-гликопротеинов, относящихся к АВС-транспортерам. Методом количественной ПЦР в режиме реального времени показано, что внесение ивермектина в культуру клеток не повлияло на экспрессию генов ABCB1, ABCB6, ABCB8 и генов ABCB10 [35]. На культуре клеток клеща *R. (B.) microplus* BME26-IVM, резистентных к ивермектину (ПР 4,5), получены другие данные: повышенный уровень экспрессии генов АВС-транспортеров был зарегистрирован в клетках, подвергнутых обработке ивермектином. Устойчивость к ивермектину снижалась при инкубации клеток с циклоспорином А — ингибитором АВС-транспортеров. Сопоставимые результаты получены в экспериментах, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo*, что указывает на вовлеченность АВС-транспортеров в механизм резистентности [42].

Вместе с тем в ряде работ не обнаружено усиления экспрессии АТФ-зависимых транспортных белков у резистентных насекомых при воздействии инсектицида. В качестве примера можно привести результаты нескольких исследований. Так, при изучении устойчивых к темефосу малярийных комаров *An. stephensi* синергизма между ингибиторами АВС-транспортеров и инсектицидом не выявлено. Результаты, полученные при исследовании профилей экспрессии шести генов, кодирующих АВС-транспортеры, у резистентных и чувствительных к инсектициду особей сопоставимы [44]. Для двух рас паутинного клеща высоко резистентных к абамектину (239 × и 4753×, соответственно), показано, что АВС-транспортеры не играют роли в формировании резистентности, поскольку предварительная обработка клещей верапамилом не снижала их устойчивости к абамектину [26]. Установлена повышенная экспрессия генов ABCC1 у обыкновенной черёмуховой тли *Rhopalosiphum padi* L., обработанной имидаклопридом и хлорпирифосом. Однако синергическое действие на насекомых резистентных линий (1,33 и 1,26) было ниже, чем на чувствительных особей (2,72 и 1,64 раза, соответственно) [24].

Глобальный характер, который приобрела в последнее десятилетие проблема резистентности членистоногих к инсектицидам, требует объяснения основ этого явления. Происходящие под воздействием инсектицидного пресса микроэволюционные процессы в популяциях насекомых приводят к развитию резистентности за счет разнообразных механизмов. Некоторые из них известны уже давно: в первую очередь, это специфические механизмы — снижение чувствительности мишеней инсектицидов (устойчивость *kdr*- и *rdl*-типа, устойчивая ацетилхолинэстераза и пр.). На протяжении последнего десятилетия идет интенсивное изучение молекулярных основ таких механизмов резистентности, как снижение проницаемости кутикулы для инсектицидов и усиление активности АВС-транспортеров. Однако число работ, посвященных изучению сразу нескольких механизмов резистентности к пестицидам в конкретных популяциях насекомых, ограничено. К настоящему времени комплекс механизмов резистентности исследован у небольшого числа видов членистоногих: в основном это либо классические модельные объекты, например, мухи рода *Drosophila*, либо виды, имеющие важное медицинское или хозяйственное значение — кровососущие комары, иксодовые клещи, несколько видов совок и др.

Сложные, взаимодополняющие друг друга, пути развития резистентности у насекомых и клещей представляют собой важную фундаментальную проблему, решение которой будет иметь огромное прикладное значение: результаты таких исследований могут лечь в основу разработки ДНК-инсектицидов в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Перегуда Т.А., Рославцева С.А., Агашкова Т.М. О составе эпикутикулы комнатных мух, устойчивых к кумафосу и карбофосу // Химия в сельском хозяйстве. – 1979. – № 8. – С. 24-25.
2. Ahmad M., Denholm I., Bromilow R.H. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan // Pest. Manag. Sci. 2006. Vol. 62. – P. 805-810.
3. Andersson O., Badisco L., Hansen A.H., Hansen S.H., Hellman K., Nielsen P.A., Olsen L.R., Verdonck R., Abbott N.J., Vanden Broeck J., Andersson G. Characterization of a novel brain barrier *ex vivo* insect-based P-glycoprotein screening model // Pharmacol. Res. Perspect. – 2014. – Vol. 2, № 4. – e00050.
4. Aurade R.M., Jayalakshmi S.K., Sreeramulu K. P-glycoprotein ATPase from the resistant pest, *Helicoverpa armigera*: purification, characterization and effect of various insecticides on its transport function // Biochim Biophys Acta. – 2010. – Vol. 1798, № 6. – P.1135-1143.
5. Awolola T.S., Oduola O.A., Strode C., Koekemoer L.L., Brooke B., Ranson H. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria // Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2009. – Vol. 103. – P. 1139–1145.
6. Balabanidou V., Kampouraki A., MacLean M., Blomquist G.J., Tittiger C., Juárez M.P., Mijailovsky S.J., Chalepakis G., Anthousi A., Lynd A., Antoine S., Hemingway J., Ranson H., Lycett G.J., Vontas J. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2016. – Vol. 113. № 33. – P. 9268-9273.
7. Bariami V., Jones C.M., Poupardin R., Vontas J., Ranson H. Gene amplification, abc transporters and cytochrome p450s: Unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti* // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2012. – Vol. 6. – № 6. – e1692.
8. Borst P., Schinkel A.H. P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals // J. of Clinical Investigation. – 2013. – Vol. 123, № 10. – P. 4131–4133.
9. Broehan G., Kroeger T., Lorenzen M., Merzendorfer H. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum* // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – P. 6.
10. Buss D., Callaghan A. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: A survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance // Pestic. Biochem. Physiol. – 2008. – Vol. 90. № 3. – P. 141–153.
11. Buss D.S., McCaffery A.R., Callaghan A. Evidence for p-glycoprotein modification of insecticide toxicity in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex // Med. Vet. Entomol. – 2002. – Vol. 16, № 2. – P. 218–222.
12. Cafarchia C., Porretta D., Mastrantonio V., Epis S., Sassera D., Iatta R., Immediato D., Ramos R.A., Lia R.P., Dantas-Torres F., Kramer L., Urbanelli S., Otranto D. Potential role of ATP-binding cassette transporters against acaricides in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* // Med. Vet. Entomol. – 2015. – Vol. 29, № 1. – P. 88-93.
13. Dassa E., Bouige P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms // Res. Microbiol. – 2001. – Vol. 152. – P. 211-229.
14. Dean M., Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2005. V. 6. P. 123-142.
15. Dermauw W., Van Leeuwen T. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance // Insect Biochem. Mol. Biol. 2014. – Vol. 45, № 1. – P. 89–110.
16. Epis S., Porretta D., Mastrantonio V., Comandatore F., Sassera D., Rossi P., Cafarchia C., Otranto D., Favia G., Genchi C., Bandi C., Urbanelli S. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi* // Parasites and Vectors. – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 349.
17. Futahashi R., Okamoto S., Kawasaki H., Zhong Y.S., Iwanaga M., Mita K., Fujiwara H. Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori* // Insect Biochem. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 38. – P. 1138–1146.

18. Gahan L.J., Pauchet Y., Vogel H., Heckel D.G. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin // PLoS genetics. – 2010. – Vol. 6, Iss.12. – e1001248.
19. Gondhalekar A.D., Scharf M.E. Mechanisms underlying fipronil resistance in a multiresistant field strain of the *German cockroach* (Blattodea: Blattellidae) // J. Med. Entomol. – 2012. – Vol. 49, № 1. – P. 122-131.
20. Gunning R.V. Bioassay for detecting pyrethroid nerve insensitivity in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) // J. Econ. Entomol. – 1996. – Vol. 89. – P. 816-819.
21. Guseman A.J., Miller K., Kunkle G., Dively G.P., Pettis J.S., Evans J.D., et al. Multi-drug resistance transporters and a mechanism-based strategy for assessing risks of pesticide combinations to honey bees // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, Iss.2. – e0148242.
22. Hawthorne D.J., Dively G.P. Killing them with kindness? In-hive medications may inhibit xenobiotic efflux transporters and endanger honey bees // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, Iss.11. – P. 6.
23. Johnson R.M., Dahlgren L., Siegfried B.D., Ellis M.D. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*) // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, Iss.1. – e0054092.
24. Kang X.-L., Zhang M., Wang K., Qiao X.-F., Chen M.-H. Molecular cloning, expression pattern of multidrug resistance associated protein 1 (MRP1, ABCC1) gene, and the synergistic effects of verapamil on toxicity of two insecticides in the bird cherry-oat aphid // Arch. Insect Biochem. Physiol. – 2016. – Vol. 92. № 1. – P. 65-84.
25. Koganemaru R., Miller D.M., Adelman Z.N. Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes // Pestic. Biochem. Physiol. – 2013. – Vol. 106. – P.190-197.
26. Kwon D.H., Seong G.M., Kang T.J., Lee S.H. Multiple resistance mechanisms to abamectin in the two-spotted spider mite // J. of Asia-Pacific Entomology. – 2010. – Vol. 13. № 3. – P. 229-232.
27. Labbe R., Caveney S., Donly C. Genetic analysis of the xenobiotic resistance-associated ABC gene subfamilies of the Lepidoptera // Insect Mol. Biol. – 2011. – Vol. 20. – P. 243-256.
28. Lanning C.L., Fine R.L., Corcoran J.L., Ayad H.M., Rose R.L., Abou-Donia M.B. Tobacco budworm p-glycoprotein: biochemical characterization and its involvement in pesticide resistance // Biochem. Biophys. Acta. – 1996. – Vol. 1291. – P. 155-162.
29. Lara F.A., Pohl P.C., Gandara A.C., Ferreira J.S., Nascimento-Silva M.C., Bechara G.H., Sorgine M.H., Almeida I.C., Vaz I.D.S., Oliveira P.L. ATP binding cassette transporter mediates both heme and pesticide detoxification in tick midgut cells // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, Iss.8. – e0134779.
30. Lilly D.G., Latham S.L., Webb C.E., Doggett S.L. Cuticle thickening in a pyrethroid-resistant strain of the common bed bug, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae) // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, Iss 4. – e0153302.
31. Liu S., Zhou S., Tian L., Guo E., et al. Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori* // BMC Genomics. – 2011. – Vol. 12. – P. 491.
32. Liu Y.J., Shen J.L. Biochemical mechanism and genetics of resistance to lambda-cyhalothrin in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and the relative fitness of the resistant strain // Acta Entomol. Sin. – 2003. – Vol. 46. – P. 567-572.
33. Luo L., Sun Y.-J., Wu Y.-J. Abamectin resistance in *Drosophila* is related to increased expression of P-glycoprotein via the dEGFR and dAkt pathways // Insect Biochem. Mol. Biol. – 2013. – Vol. 43, № 8. – P. 627-634.
34. Mamidala P., Wijeratne A.J., Wijeratne S., Kornacker K., Sudhamalla B., Rivera-Vega L.J., Hoelmer A., Meulia T., Jones S.C., Mittapalli O. RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13. № 1. – P.6.
35. Mangia C., Vismarra A., Kramer L., Bell-Sakyi L., Porretta D., Otranto D., Epis S., Grandi G. Evaluation of the in vitro expression of ATP binding-cassette (ABC) proteins in an *Ixodes ricinus* cell line exposed to ivermectin // Parasites and Vectors. – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 1497.
36. Merzendorfer H. ABC transporters and their role in protecting insects from pesticides and their metabolites // Advances in Insect Physiology. – 2014. – Vol. 46. – P. 1-72.
37. Mounsey K.E., Holt D.C., McCarthy J., Walton S.F. Identification of ABC transporters in *Sarcoptes scabiei* // Parasitology. – 2006. – Vol. 132, Pt. 6. – P. 883-892.

38. Ottea J.A., Ibrahim S.A., Younis A.M., Young R.J. Mechanisms of pyrethroid resistance in larvae and adults from a cypermethrin-selected strain of *Heliothis virescens* (F.). Pest. Biochem. Physiol. – 2000. – Vol. 66. – P. 20-32.
39. Pan C., Zhou Y., Mo J. The clone of laccase gene and its potential function in cuticular penetration resistance of *Culex pipiens pallens* to fenvalerate // Pest. Biochem. Physiol. – 2009. – Vol. 93. – P. 105-111.
40. Pedrini N., Mijailovsky S.J., Girotti J.R., Stariolo R., Cardozo R.M., Gentile A., Juarez M.P. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2009. – Vol. 3, № 5: e434.
41. Podsiadlowski L., Matha V., Vilcinskas A. Detection of a p-glycoprotein related pump in Chironomus larvae and its inhibition by verapamil and cyclosporine A. // Comp. Biochem. Physiol. – 1998. – Vol. 121. – P. 443-450.
42. Pohl P.C., Carvalho D.D., Daffre S., Vaz I.d.S. Jr., Masuda A. In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism // Vet. Parasitol. – 2014. – Vol. 204, № 3-4. – P. 316-322.
43. Pohl P.C., Klafke G.M., Júnior J.R., J. Martins, Vaz I.d.S. Jr, Masuda A. ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* // Parasitology Research. – 2012. – Vol. 111, №6. – P. 2345-2351.
44. Porretta D., Epis S., Mastrantonio V., Ferrari M., Bellini R., Favia G., Urbanelli S. How heterogeneous is the involvement of ABC transporters against insecticides? // Acta Tropica. – 2016. – Vol. 157. – P. 131-135.
45. Porretta D., Gargani M., Bellini R., Medici A., Punelli F., Urbanelli S. Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps // Med. Vet. Entomol. – 2008. – Vol. 22, № 1. – P. 48-54.
46. Qiu X., Sun W., McDonnell C.M., Li-Byarlay H., D Steele L., Wu J., Xie J., Muir W.M., Pittendrigh B.R. Genome-wide analysis of genes associated with moderate and high DDT resistance in *Drosophila melanogaster* // Pest Manag. Sci. – 2013. – Vol. 69. – P. 930-937.
47. Roth C.W., Holm I., Graille M., Dehoux P., et al. Identification of the Anopheles gambiae ATP-binding cassette transporter superfamily genes // Mol. Cells. – 2003. – Vol. 15. – P.150-158.
48. Sharma A., Mishra M., Ram K.R., Kumar R., Abdin M.Z., Chowdhuri D.K. Transcriptome analysis provides insights for understanding the adverse effects of endosulfan in *Drosophila melanogaster* // Chemosphere. – 2011. – Vol.82. № 3. – P.370-376.
49. Soderlund D.M., Knipple D.C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides // Insect Biochem. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 33, №6. – P.563-577.
50. Sparks T.C., Nauen R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management // Pestic. Biochem. Physiol. – 2015. – V. 121. – P. 122-128.
51. Tarnay J.N., Szeri F., Ilias A., Annilo T., Sung C., LeSaux O., Varadi A., Dean M., Boyd C.D., Robinow S. The dMRP/CG6214 gene of *Drosophila* is evolutionarily and functionally related to the human multidrug resistance associated protein family // Insect Mol. Biol. – 2004. – Vol. 13. – P. 539-548.
52. Vannini L., Reed T. W., Willis J. H. Temporal and spatial expression of cuticular proteins of Anopheles gambiae implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species // Parasites Vectors. – 2014. – Vol. 7. – P. 24.
53. Vontas J., David J.P., Nikou D., Hemingway J., Christophides G.K., Louis C., Ranson H. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization // Insect Mol. Biol. – 2007. – Vol. 16. – P. 315-324.
54. Wei Y., Appel A.G., Moar W.J., Liu N. Pyrethroid resistance and cross – resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L) // Pest. Manag. Sci. – 2001. – Vol.57, № 11. – P.1055-1059.
55. Willis J.H. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomic era // Insect Biochem. Mol. Biol. – 2010. – Vol. 40. №3. – P. 189-204.
56. Wood O., Hanrahan S., Coetzee M., Koekemoer L., Brooke B. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* // Parasit Vectors. – 2010. – Vol. 3. – P. 67.

57. Wu D., Scharf M.E., Neal J.J., Suiter D.R., Bennett G.W. Mechanisms of fenvalerate resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L) // Pestic Biochem Physiol. – 1998. – Vol. 61. – P. 53–62.
58. Yoon K.S., Strycharz J.P., Baek J.H., Sun W., Kim J.H., Kang J.S., et al. Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance // Insect Molecular Biology. – 2011. – Vol. 20, № 6. – P. 687–699.
59. Yu S.J. The toxicology and biochemistry of insecticides. Taylor and Francis Group, LLC, 2008. – 276 p.
60. Zhu F., Gujar H., Gordon J.R., Haynes K.F., Potter M.F., Palli S.R. Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides // Sci Rep. – 2013. – Vol. V. 3. – P. 1456.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №16-04-01337а).