

АКТИВАЦИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПОЧВЕННОЙ НЕМАТОДЫ CAENORHABDITIS ELEGANS МАУРАС СОКОМ ALLIUM SATIVUM L.

ACTIVATION OF CHOLINERGIC SYSTEM OF SOIL NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS MAUPAS BY ALLIUM SATIVUM L. JUICE

**A. Egorova
R. Kolsanova
T. Kalinnikova**

Summary. In experiments with soil nematode *C. elegans* it was shown that *Allium sativum* juice is toxic for nematodes. The target of toxic action of *A. sativum* is *C. elegans* nervous system. *A. sativum* juice increased the sensitivity of *C. elegans* organism to negative action of levamisole, agonist of nicotinic acetylcholine receptors. *A. sativum* juice also increased the nematodes sensitivity to the rise in endogenous acetylcholine level by partial inhibition of acetylcholine esterase by aldicarb. The results of this work show that the mechanism of toxic action of *A. sativum* juice consists in activation of nematodes' cholinergic system.

Keywords: *Allium sativum*, anthelmintic drugs, *Caenorhabditis elegans*, levamisole, nicotinic acetylcholine receptors.

Егорова Анастасия Васильевна

*М.н.с., Институт проблем экологии
и недропользования Академии наук Республики
Татарстан, г. Казань
egorovanastassia@gmail.com*

Колсанова Руфина Рифкатовна

*К.б.н., н.с., Институт проблем экологии
и недропользования Академии наук Республики
Татарстан, г. Казань
rufina@kolsanova.com*

Калинникова Татьяна Борисовна

*К.б.н., Институт проблем экологии
и недропользования Академии наук Республики
Татарстан, г. Казань
tbkalinnikova@gmail.com*

Аннотация. В экспериментах с почвенными нематодами *C. elegans* показано, что сок *Allium sativum* токсичен для нематод. Мишенью токсического действия *A. sativum* является нервная система *C. elegans*. Сок *A. sativum* повышает чувствительность организма *C. elegans* к негативному действию агониста никотиновых рецепторов левамизола. Сок *A. sativum* усиливает чувствительность нематод и к повышению уровня эндогенного ацетилхолина частичным ингибированием ацетилхолинэстеразы алдикарбом. Результаты работы показывают, что механизмом токсического действия *A. sativum* является активация холинергической системы нематод.

Ключевые слова: *Allium sativum*, антигельминтные препараты, *Caenorhabditis elegans*, левамизол, никотиновые рецепторы ацетилхолина.

Введение

Гельминты — одна из самых распространенных групп паразитов, поражающих человека, животных и растения. По данным Всемирной организации здравоохранения различными гельминтозами поражены не менее 2 млрд. человек, 135 тыс. человек ежегодно погибают от гельминтозов. Ежегодный ущерб, причиняемый гельминтами животноводству и растениеводству, оценивается в несколько миллиардов долларов [1].

В настоящее время основным средством лечения и профилактики гельминтозов у человека и животных являются синтетические нематоциды, относящиеся к разным химическим группам. Для борьбы с фитонематодами в растениеводстве и лесном хозяйстве также применяются химические препараты системного дей-

ствия. В последние десятилетия возрастает интерес к использованию для защиты растений от паразитических нематод и насекомых вторичных метаболитов растений, обладающих инсектицидной и нематоцидной активностью. В медицине и ветеринарии тоже наметилась тенденция к использованию растительных препаратов для лечения и профилактики гельминтозов. Это объясняется двумя причинами. Во-первых, большинство химических препаратов при их интенсивном применении быстро утрачивают свою эффективность вследствие отбора устойчивых к ним форм гельминтов. Во-вторых, во многих странах активно развивается так называемое органическое сельское хозяйство, философия которого подразумевает полный отказ от использования химических средств защиты растений от вредителей и переход на растительные препараты для профилактики и лечения заболеваний животных. В научной литературе даже

появился термин «этноветеринария» для характеристики разведения животных без использования традиционных лекарственных форм [2–3].

Одним из растений, используемых в народной медицине и этноветеринарии для лечения гельминтозов, является чеснок *Allium sativum* L. Лечебные свойства этого растения известны человечеству уже более 5000 лет. В народной медицине используются его антимикробные и противопаразитарные свойства, им лечат заболевания сердечнососудистой и эндокринной системы, различные простудные заболевания и др. Лечебные свойства чеснока определяются его химическим составом. *A. sativum* содержит по меньшей мере 33 серусодержащих органических соединений, 17 аминокислот и минеральные вещества, в частности селен. Наибольшей биологической активностью обладает аллицин. В интактных растениях чеснока в вакуолях содержится фермент аллииназа, а в цитоплазме — аминокислота аллиин. При механическом разрушении клеток эти компоненты вступают во взаимодействие, вследствие чего образуется аллицин [4].

В ветеринарии для лечения гельминтозов животных используют сок *A. sativum*, спиртовые и водные экстракты, полученные из луковок *A. sativum*. Имеющиеся в литературе немногочисленные данные об эффективности использования *A. sativum* в качестве антигельминтного средства в исследованиях *in vivo* противоречивы. При выпаивании овцам разведенного сока чеснока в течение недели существенно снижалась зараженность животных стронгилезом и трихостронгилезом [5]. Водный экстракт *A. sativum* при однократном пероральном введении снижал зараженность овец *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomum* spp. и *Strongyloides* spp. в последующие три недели, хотя был менее эффективен, чем альбендазол [2]. Пероральное введение водного экстракта *A. sativum* в течение 60 дней снижало зараженность бенгальских черных коз гельминтами в 2–7 раз [6]. Пероральное введение сока *A. sativum* козам бурской породы привело к снижению зараженности животных *Haemonchus contortus* через две недели после обработки, но разница с контрольной группой была статистически недостоверной [7]. Однократное пероральное применение этанольного экстракта *A. sativum* не оказало влияния на степень зараженности овец *Haemonchus* spp. [8].

Исследование эффективности антигельминтных препаратов *in vitro* сопряжено с определенными трудностями. Тем не менее, в научной литературе имеются результаты по изучению антигельминтных свойств *A. sativum* *in vitro*. В исследовании D. Kanojija с соавторами [2] показано, что водный и спиртовый экстракты *A. sativum* в концентрации 12,5–200 мг/мл полностью подавляют

развитие яиц гельминтов. Как водный, так и спиртовый экстракты в концентрациях 25–200 мг/мл останавливали развитие личинок паразитов на третьей стадии. Более высокие концентрации экстрактов (100 и 200 мг/мл) вызывали паралич личинок гельминтов на третьей стадии развития. В другом исследовании [3] сравнивалась эффективность антигельминтного действия водного и спиртового экстрактов *A. sativum* на развитие яиц и личинок *Toxocara canis* и *Ancylostoma caninum*. Водный экстракт *A. sativum* не оказывал негативного влияния на развитие яиц и подвижность личинок *T. canis* и *A. caninum*. Спиртовый же экстракт подавлял развитие 78–100% яиц *A. caninum* и 70–90% яиц *T. canis*, не оказывая влияния на подвижность личинок.

В настоящее время остается открытым вопрос как о механизмах антигельминтного и инсектицидного действия *A. sativum*, так и о вторичных метаболитах этого растения, обладающих антигельминтными и инсектицидными свойствами. Как уже упоминалось, биологическая активность *A. sativum* в основном определяется аллицином. При этом прямые доказательства антигельминтной активности аллицина отсутствуют. Более того, показана неэффективность аллицина при лечении аскаридоза, вызванного *Ascaridia galli*, у цыплят [9].

Изучение прямого действия нематоцидов на гельминтов трудоемко и небезопасно для исследователей. В исследованиях *in vivo* эффективность действия препарата оценивают по изменению количества яиц гельминтов в экскрементах животных [2, 5–8]. Эксперименты *in vitro*, как правило, включают в себя культивирование паразитических гельминтов в лаборатории [2–3]. Для повышения эффективности и снижения себестоимости оценки биологической активности синтетических нематоцидов в последние десятилетия успешно используется свободноживущая почвенная нематода *Caenorhabditis elegans*. Возможность экстраполяции результатов, полученных в тестах на *C. elegans*, на паразитических нематод определяется общим планом строения тела, сравнительной физиологией, фармакологией и нейрохимией Nematoda [10–11]. Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию эффективности действия синтетических нематоцидов на *C. elegans*, антигельминтная активность вторичных метаболитов растений для этого организма ранее не изучалась. Поэтому целью работы было исследование токсического действия сока *A. sativum* на организм *C. elegans*.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили с *Caenorhabditis elegans* линии дикого типа N2, доступной в *Caenorhabditis*

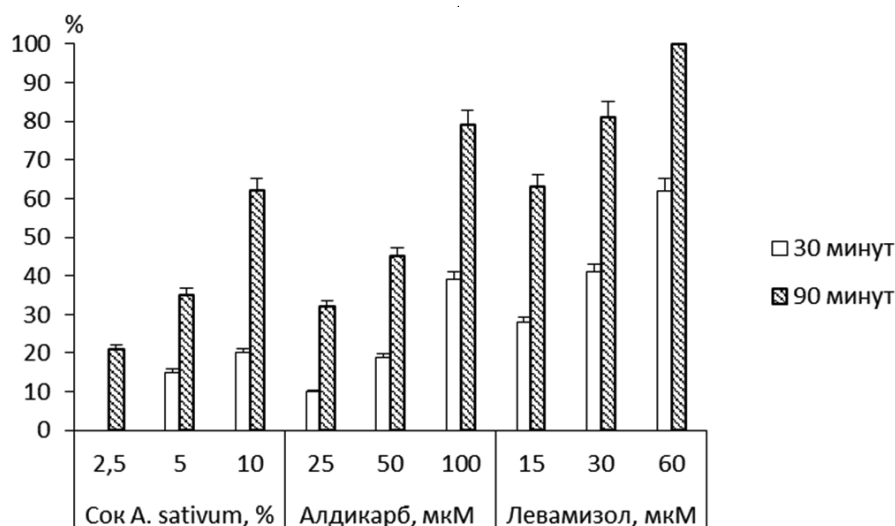


Рис. 1. Влияние сока *Allium sativum*, алдикарба и левамизола на поведение *C. elegans*.

Genetics Center. Нематод выращивали при 22 °С в чашках Петри со стандартной средой выращивания нематод (3 г/л NaCl, 17 г/л бактоагар, 2,5 г/л бактопептон, 5 мг/л холестерин, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgSO₄, 25 мл/л калийфосфатный буфер (рН 6.0)), засеянной *E. coli* OP50 [12]. Эксперименты проводили в NG буфере (3 г/л NaCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgSO₄, 25 мл/л калийфосфатный буфер (рН 7.0)) [12] с гермафродитами 2-дневного возраста.

Для изучения токсического действия *A. sativum* на организм *C. elegans* исследовали влияние сока при его разбавлении NG буфером на плавание *C. elegans*, индуцированное механическим стимулом (встряхивание пробирки с нематодой). Критериями токсического действия сока *A. sativum* на организм *C. elegans* служили нарушения моторной программы плавания нематод, индуцированного механическим стимулом, и паралич нематод — полная потеря способности к плаванию.

Для получения сока луковицы *A. sativum* измельчали в пластмассовом гомогенизаторе. Сок отжимали вручную через мельничный газ. После отжима сок дополнительно фильтровали через мельничный газ с диаметром ячеек 35 мкм. До начала эксперимента свежесжатый сок отстаивали в течение 20 часов при температуре 6 °С. Часть сока замораживали и хранили при температуре –18 °С; замороженный сок размораживали в день эксперимента при комнатной температуре. В экспериментах использовали сок, разбавленный NG буфером до нужной концентрации.

В работе использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich. Статистическую обработку результатов проводили с использованием углового преобразования Фишера φ*.

Результаты и обсуждение

Сок *A. sativum* в концентрации 5 и 10% вызывал нарушения моторной программы плавания нематод уже через 30 мин инкубации с ним при температуре 22 °С, причем его токсическое действие усиливалось при увеличении времени инкубации. Токсичность сока *A. sativum* при концентрации 2,5% проявлялась у 21% нематод лишь через 90 минут инкубации, но также усиливалась во времени (рис. 1). Увеличение времени инкубации до четырех часов вызывало наступление паралича у части нематод (рис. 2). Умеренное повышение температуры до 31 °С, хорошо переносимое нематодами усиливало токсическое действие сока *A. sativum* (рис. 2). Хранение сока *A. sativum* при –18 °С в течение недели не снижало, а, наоборот, увеличивало его токсичность для *C. elegans* (рис. 2).

По оси ординат доля нематод с нарушенным поведением (в %) после 30 и 90 минут экспозиции к токсикантам при температуре 22 °С. По оси абсцисс концентрация токсикантов.

По оси ординат доля нематод, у которых наступил паралич (в %) после 4- часовой экспозиции к соку *Allium sativum*. По оси абсцисс условия эксперимента.

Действие сока *A. sativum* на организм *C. elegans* сходно с действием известных нематоцидов — левамизола и алдикарба. Во всех случаях наблюдаются нарушения моторной программы плавания, индуцированного механическим стимулом, при сохранении нематодами способности к плаванию. При увеличении концентрации токсиканта или продолжительности воздействия наступает паралич нематод (рис. 2).

Таблица 1. Влияние сока *Allium sativum* и левамизола на поведение *C. elegans*.
Эксперименты проводили при температуре 22 °С.

Условия эксперимента	Доля нематод с нарушениями моторной программы плавания, %				
	Время экспозиции к токсикантам, мин				
	15	30	60	90	120
Сок <i>A. sativum</i> 2.5% 5% 10%	0	0	0	21±1	34±1
	0	15±1	29±1	35±1	69±2
	0	20±1	43±2	62±2	91±3
Левамизол 30мкМ 60мкМ 120мкМ	0	41±2	54±3	81±4	100
	21±1	62±3	79±4	100	-
	40±2	82±2	100	-	-
	-	-	-	-	-

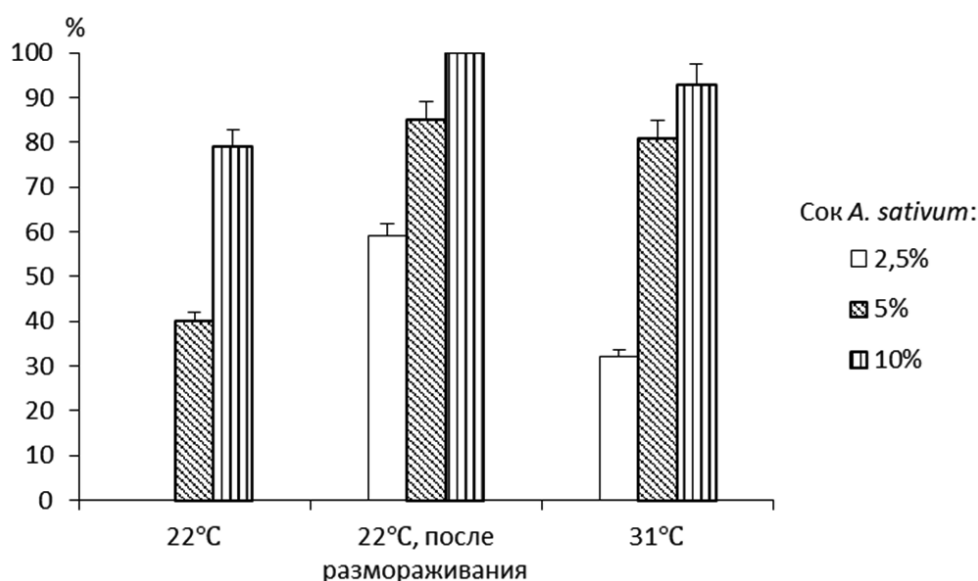


Рис. 2. Токсическое действие сока *Allium sativum* на организм *C. elegans*.

Сходство нарушения поведения нематод соком *A. sativum* и левамизолом позволило предположить, что мишенью токсического действия сока *A. sativum* на организм *C. elegans* могут быть н-холинорецепторы. Это предположение подтверждается результатами экспериментов, в которых исследовалась модуляция чувствительности н-холинорецепторов к левамизолу соком *A. sativum*. Известно, что 15-минутная экспозиция *C. elegans* к левамизолу вызывает нарушения моторной программы плавания нематод, индуцированного механическим стимулом [13]. Действие сока *A. sativum* на организм *C. elegans* наступает в более поздние сроки, и при 15-минутной экспозиции не оказывает влияния на поведение нематод (табл. 1). Но в условиях этого эксперимента компоненты сока *A. sativum* увеличивали чувствительность поведения нематод к левамизолу, поскольку при совместном действии двух токсикантов — сока *A. sativum* и левамизола — нарушения моторной программы плавания левамизолом усиливались (рис. 3).

По оси ординат доля нематод, у которых наступил паралич (в %) после 90 минут экспозиции к соку *A. sativum* и левамизолу при температуре 22 °С. По оси абсцисс концентрация левамизола.

Левамизол вызывает нарушения локомоции *C. elegans* за счет гиперактивации н-холинорецепторов в системе нейронов, регулирующей плавание нематод, либо в мышцах [13]. Поэтому результаты нашей работы свидетельствуют о повышении чувствительности н-холинорецепторов к левамизолу компонентами сока *A. sativum*. Алдикарб вызывает сходные с левамизолом нарушения локомоции *C. elegans*. В этом случае причиной гиперактивации н-холинорецепторов является повышение уровня эндогенного ацетилхолина ингибированием ацетилхолинэстеразы [14–15]. В наших экспериментах сок *A. sativum* повышал чувствительность локомоции *C. elegans* к левамизолу (рис. 3). В этих экспериментах концентрации левамизола, вызывающие паралич нематод,

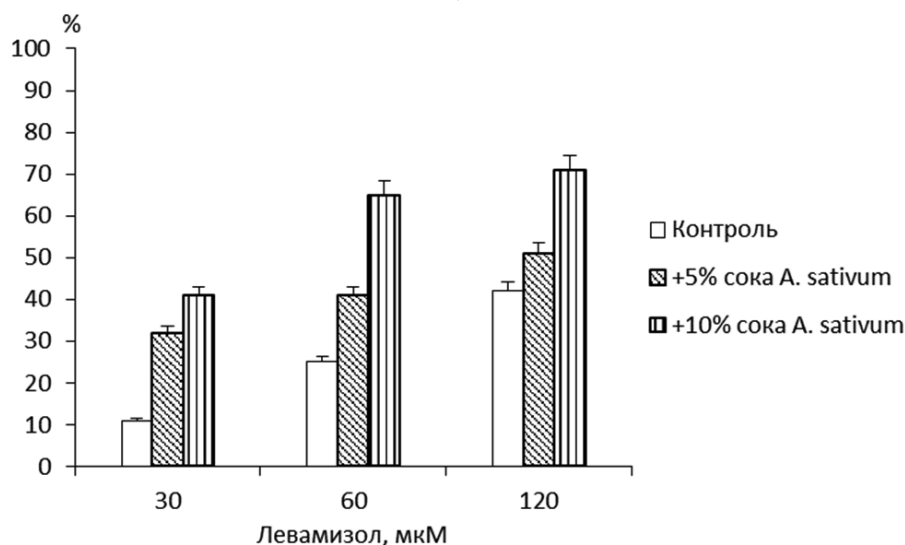


Рис. 3. Токсическое действие сока *A. sativum* и левамизола на организм *C. elegans*.

существенно снижались при добавлении в среду инкубации сока *A. sativum*.

Сок *A. sativum* может увеличивать чувствительность локомоции *C. elegans* к левамизолу благодаря наличию в нем неидентифицированных вторичных метаболитов, непосредственно действующих на холинергическую систему нематод и, как следствие, повышающих чувствительность н-холинорецепторов к левамизолу (рис. 3). Сенситизация н-холинорецепторов является одним из механизмов активации холинергической системы нематод для повышения скорости избегания неблагоприятных локальных условий [13]. В наших экспериментах сок *A. sativum* вызывал нарушения моторной программы плавания и паралич нематод (рис. 1–2, табл. 1), что нельзя объяснить адаптивной стресс-реакцией организма.

Вторым возможным объяснением сенситизации организма *C. elegans* компонентами сока *A. sativum* к левамизолу является активация ноцицептивных нейронов, дендриты которых контактируют с окружающей средой [16–17]. Эти нейроны воспринимают информацию о неблагоприятных для организма факторах среды. Сигналы из ноцицептивных нейронов поступают в интернейроны и индуцируют адаптивную реакцию избегания неблагоприятных локальных сред [16–17]. В пользу этого объяснения свидетельствуют несколько фактов. Известно, что *A. sativum* для *C. elegans* является репеллентом [18]. Сигналы из ноцицептивных нейронов, чувствительных к повреждающей организм высокой температуре, вызывают сенситизацию н-холинорецепторов *C. elegans* [13]. Поэтому быстрая сенситизация н-холинорецепторов компонентами сока *A. sativum* может быть

проявлением неспецифической адаптивной реакции холинергической системы *C. elegans* на неблагоприятные для нематод изменения окружающей среды (наличие токсикантов и превышение физиологического оптимума температуры). При длительной (90–120 минут) инкубации нематод с соком *A. sativum* наблюдался синергизм в действии *A. sativum* и левамизола на локомоцию *C. elegans* (рис. 3). Это может быть результатом сенситизации н-холинорецепторов, которая не является следствием активации ноцицептивных нейронов метаболитами *A. sativum*, поскольку эти нейроны достаточно быстро адаптируются к действию токсикантов [16].

Результаты работы свидетельствуют о токсичности вторичных метаболитов *A. sativum* не только для паразитических нематод [2–3, 5–8], но и для *C. elegans* (рис. 1–3, табл. 1). Сходство в токсическом действии синтетических нематоцидов и вторичных метаболитов растений на организмы паразитических нематод и организм *C. elegans* объясняется консерватизмом эволюции нематод. Очевидно, что причиной токсического действия *A. sativum* на организм *C. elegans* являются нарушения интегративных функций нервной системы, поскольку оно проявляется в нарушениях локомоции и параличе нематод (рис. 1–3, табл. 1). Эти нарушения сходны с теми, которые происходят при действии левамизола [13]. Усиление токсического действия левамизола на организм *C. elegans* компонентами сока *A. sativum* свидетельствует о том, что *A. sativum* сенситизирует н-холинорецепторы L-подтипа.

Таким образом, *C. elegans* может быть использована для дальнейшего изучения антигельминтной активности *A. sativum* с целью идентификации компонентов

сока, определяющих его токсическое действие на гельминтов. Кроме того, *C. elegans* может быть использована для предварительной оценки антигельминтной активности сока *A. sativum* перед его применением у животных, поскольку биологическая активность вторичных метаболитов растений варьирует в зависимо-

сти от условий их выращивания и хранения. Синергизм в действии сока *A. sativum* и левамизола открывает возможность создания и применения сложных антигельминтных препаратов, состоящих из синтетических нематоцидов–агонистов n-холинорецепторов и экстрактов *A. sativum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кляритская И.Л., Вильцанюк И. А., Григоренко Е. И., Чернуха С. Н. Современные представления о лечении и диагностике гельминтозов // Крымский терапевтический журнал. 2010. № 2. С. 144–147.
2. Kanojija D., Shanker D., Sudan V., Jaiswal A. K., Parashar R. Assessment of in vitro and in vivo anthelmintic potential of extracts of *Allium sativum* bulb against naturally occurring ovine gastrointestinal nematodiosis // Vet. Quart. 2015. V. 35. P. 200–206.
3. Orengo K.O., Maitho T., Mbaria J. M., Maingi N., Kitaa J. M. In vitro anthelmintic activity of *Allium sativum*, *Allium cepa* and *Jatropha curcas* against *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum* // African J. Pharmac. Pharmacol. 2016. V. 10. P. 465–471.
4. Kadam P.U., Kharde M. R., Lamage S. T., Borse S. L., Borse L. B., Pawar S. P. Anthelmintic activity of *Allium sativum* // Pharma Sci. Monitor. 2015. V. 6. P. 25–37.
5. Masamha B., Gadzyrayi C. T., Mukutirwa I. Efficacy of *Allium sativum* (garlic) in controlling nematodes parasites in sheep // Intern. J. Appl. Res. Vet. Med. 2010. V. 8. P. 161–169.
6. Hasan M.M.I., Begum S., Islam S., Rahman M. M., Belal S. A., Hossain M. A., Akanda M. R., Pal N. C., Howlader M. M.R. Effects of garlic supplementation on parasitic infestation, live weight, and hematological parameters in Black Bengal goat // J. Adv. Vet. Anim. Res. 2015. V. 2 P. 326–331.
7. Worku M., Franco R., Baldwin K. Efficacy of garlic as an anthelmintic in adult boer goats // Arch. Biol. Sci. 2009. V. 61. P. 135–140.
8. Santos F.C.C., Carvalho N. U.V. Alcoholic tincture of garlic (*Allium sativum*) on gastrointestinal endoparasites of sheep — short communication // Ciênc. Anim. Bras. 2014. V. 15. P. 115–118.
9. Velkers F.C., Dieho K., Pecher F.W.M., Vernooij J. C.M., van Eck J. H.H., Landman W. J.M. Efficacy of allicin from garlic against *Ascaridia galli* infection in chickens // Poultry Sci. — 2011. — V. 90. — P. 364–368.
10. Dent J. A. What can *Caenorhabditis elegans* tell us about nematocides and parasites // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2001. V. 6. P. 252–263.
11. Holden-Dye L., Walker R. J. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans* // Wormbook, ed. The *C. elegans* Research Community. 2014. Режим доступа: <http://www.wormbook.org>, свободный.
12. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* // Genetics. 1974. V. 77. P. 71–94.
13. Kalinnikova T.B., Kolsanova R. R., Belova E. B., Shagidullin R. R., Gainutdinov M. Kh. Opposite responses of the cholinergic nervous system to moderate heat stress and hyperthermia in two soil nematodes // J. Therm. Biol. 2016. V. 62. P. 37–49.
14. Mahoney T.R., Luo S., Nonet M. L. Analysis of synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* using an aldicarb-sensitivity assay // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 1772–1777.
15. Jospin M., Qi Y. B., Stawicki T. M., Boulin T., Schuske K. R., Horvitz R., Bessereau J.-L., Jorgensen E. M., Jin Y. A neuronal acetylcholine receptor regulates the balance of muscle excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans* // PLoS Biology. 2009. V. 7. e1000265.
16. Sambongi Y., Nagae T., Liu Y., Yoshimizu T., Takeda K., Wada Y., Futai M. Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans* // NeuroReport. 1999. V. 10. P. 753–757.
17. Hilliard M.A., Bargmann C. I., Bazzicalupo P. C. *elegans* responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail // Curr. Biol. 2002. V. 12. P. 730–734.
18. Bargmann C. I. Genetic and cellular analysis of behavior in *C. elegans* // Annu. Rev. Neurosci. 1993. V. 16. P. 47–71.

© Егорова Анастасия Васильевна (egorovanastassia@gmail.com),

Колсанова Руфина Рифкатовна (rufina@kolsanova.com), Калининкова Татьяна Борисовна (tbkalinnikova@gmail.com).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»