

На правах рукописи

Тычинин Николай Дмитриевич

Экспериментальное обоснование использования антимикробных пептидов, выделенных новым методом, для лечения и профилактики сальмонеллеза цыплят

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Саратов 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова».

Научный руководитель:

Ларионова Ольга Сергеевна,
доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Сухинин Александр Александрович,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет
ветеринарной медицины, заведующий
кафедрой микробиологии, вирусологии
и иммунологии

Лысенко Юрий Андреевич,
доктор биологических наук, доцент,
ФГБОУ ВО «Российский
государственный аграрный
университет –МСХА имени
К.А.Тимирязева», профессор кафедры
ветеринарной медицины, г. Москва

Ведущая организация: ФГБОУ ВО Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону.

Защита состоится «___» _____ 2025 года в ____ 00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.02 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Вавиловский университет» и на сайте www.vavilovsar.ru

Отзывы на автореферат направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 410012, г. Саратов, г. Саратов, ул. Соколова, 335, УК № 3, диссертационный зал. ФГБОУ ВО Вавиловский университет. E-mail: vetdust@mail.ru

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2025 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Егунова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сальмонеллы являются важной группой зоонозных патогенов, которые широко распространены среди домашней птицы и вызывают сальмонеллез птиц. Это заболевание обычно приводит к значительному снижению продуктивности домашней птицы, в том числе яйценоскости кур-несушек, выводимости цыплят и задержке роста бройлеров. В результате этого мировая птицеводческая отрасль терпит серьезные экономические убытки. Другим немаловажным аспектом является то, что заражение домашней птицы сальмонеллой вызывает серьезную проблему для общественного здравоохранения во всем мире. Эффективность лечения зоонозных инфекций, к которым относится сальмонеллез, затрагивает не только экономические аспекты, но и социальные, связанные с возможным инфицированием людей.

Сальмонеллы являются убиквитарными микроорганизмами, устойчивыми к воздействию физических и химических факторов. Нерациональное использование антибиотиков способствовало селекции антибиотикорезистентных штаммов сальмонелл, что является защитным механизмом, позволяющим им выживать в стрессовых условиях окружающей среды. Лечение заболеваний, вызванных данными штаммами затруднительно, и требует поиска новых альтернативных противомикробных агентов (Carmona-Ribeiro, A. M. et al., 2014; Крылова Л.С. и др., 2019; Мусин Х.Г., 2018).

Антимикробные пептиды (АМП), выделенные из насекомых, представляют собой перспективное решение данной проблемы (Brogden, N. K. et al., 2011; Сычева, М.В., 2016). Насекомые являются одним из самых многочисленных классов беспозвоночных на планете Земля. Одним из факторов, влияющих на их выживаемость, является наличие врождённого неспецифического иммунитета, обусловленного экспрессией антимикробных пептидов (Guangshun W., 2015). АМП, согласно исследованиям ряда авторов, могут быть использованы в качестве антимикробных агентов по отношению к Грам+ и Грам- микроорганизмам, микроскопическим грибам, вирусам. Помимо этого, селекция антибиотикорезистентных штаммов под действием АМП маловероятна (Diamond, G. et al., 2009).

В этом контексте важно расширить спектр исследований антимикробных пептидов, выделяемых из различных животных и растений, что будет способствовать началу разработки прототипов препаратов на их основе с целью создания альтернативы антибиотикам, которую можно будет использовать, в том числе в животноводстве.

В настоящее время существует достаточно исследований биохимических свойств и антимикробной активности различных пептидов, но не хватает практической реализации подходов к получению данных антимикробных композиций и возможности их использования для профилактики и лечения сальмонеллеза. Для настоящего исследования в качестве источника получения пептидов были выбраны личинки насекомых. На этот выбор повлияло несколько факторов. Во-первых, насекомые необычайно широко распространены

практически во всех регионах планеты, во-вторых, они обладают достаточно сильным врождённым иммунитетом, кроме того, их достаточно легко разводить в промышленных условиях. Таким образом, возникает необходимость разработки способов получения антимикробных пептидов и изучения возможности их использования для профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят, вызванного антибиотикорезистентными штаммами.

Степень разработанности темы.

В настоящее время опубликован ряд работ отечественных и зарубежных исследователей, в которых описываются пептиды, выделенные из насекомых и других объектов, а также представлены способы их получения и антимикробные свойства (Сычева, М.В. и др., 2019). Помимо этого, были предприняты попытки практического использования данных антимикробных агентов при сальмонеллезе (Жаркова М.С. и др., 2014).

В ряде работ также приводятся доводы в пользу перспективности исследований антимикробных пептидов, выделяемых именно из насекомых (Davis, R., 2009; Giuseppantonio M. et al., 2010; Ashby, M., 2014). Выбор темы данного исследования был продиктован ее актуальностью, перспективностью использования чёрной львинки *Hermetia illucens*, как биологического объекта для получения антимикробных композиций пептидов, а также изучением возможности профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят, в том числе вызванного мультирезистентными штаммами к действию антибиотиков.

Цель работы – разработка нового метода получения антимикробных пептидов и изучение возможности их использования для профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят, вызванного в том числе антибиотикорезистентными штаммами.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать новый метод получения антимикробной композиции из пептидов *Hermetia illucens*.
2. Изучить физико-химические свойства выделенных пептидов.
3. Определить острую токсичность антимикробной композиции.
4. Оценить возможность профилактики сальмонеллеза цыплят полученной композицией антимикробных пептидов.
5. Изучить терапевтический эффект антимикробных пептидов при лечении сальмонеллеза цыплят.

Объект исследований – антимикробные пептиды, выделенные из личинок *Hermetia illucens*.

Предмет исследований – профилактический и терапевтический эффект применения композиции антимикробных пептидов при сальмонеллезе цыплят.

Научная новизна. Исследован профилактический и терапевтический эффект выделенной композиции антимикробных пептидов. Доказано, что пероральное использование полученной композиции антимикробных пептидов в течении недели, предшествующей экспериментальному заражению цыплят сальмонеллезом, оказывает профилактическое действие с эффективностью 93,3%. Максимальный терапевтический эффект возможен при сочетанном

использовании энрофлоксацина и АМП per os после появления клинических признаков заболевания при экспериментальном заражении.

Для создания композиции антимикробных пептидов нами был разработан новый метод получения пептидов из личинок чёрной львинки *H. illucens*.

Анализируя, полученные композиции пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) было выявлено, что использование эксклюзионной хроматографии позволяет получать смеси пептидов с различием в хроматографическом времени удерживания менее 1 минуты, что свидетельствует об их сходных физико-химических свойствах. Установлен размер изучаемых белковых фракций методом динамического рассеяния света (ДРС). Так, размер первой фракции белка составлял 68 - 141 нм; второй фракции – 37 - 79 нм, третьей фракции – 43 нм - 122 нм. Разработанный нами метод получения пептидов из биомассы личинок представляет собой алгоритм выделения и очистки пептидов, включающий холодную экстракцию, очистку белков, высаливание и молекулярно-ситовую хроматографию, а в дополнении с методом ДРС достоверно идентифицировать получаемые антимикробные пептиды.

Теоретическая и практическая значимость работы. Доказано, что изученные композиции антимикробных пептидов, согласно ГОСТ 32644-2014, относятся к 5 классу опасности. Показано, что эффективность при профилактике сальмонеллеза цыплят составила 93,3%. Терапевтическая эффективность лечения сальмонеллеза цыплят при внутрибрюшинном введении АМП составила 66,7%; при лечении энрофлоксацином 80%, при сочетанной терапии энрофлоксацином и АМП – 93,3%. При изучении антибиотикочувствительности штаммов сальмонелл выявлено, что штаммы *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, обладают множественной резистентностью, т.е. устойчивы к действию более чем трёх фармакологических групп антибиотиков. Однако, были выявлены несколько антимикробных препаратов высокоэффективных в отношении штаммов *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*. Так, чувствительность к цефепиму продемонстрировали штаммы: *S. Abony*, *S. Enteritidis*; *S. Infantis*, *S. Enteritidis* – к амикацину. Штамм *S. Typhimurium* был умеренно чувствителен к цефуроксиму и амикацину. Следует отметить, что изученные штаммы сальмонелл были в той или иной степени чувствительны к действию энрофлоксацина.

Основные положения и результаты используются в рамках учебного процесса и научно-исследовательской работы в следующих университетах Российской Федерации: ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова», ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет».

Методология и методы исследований. Методология диссертационной работы заключалась в разработке нового метода получения пептидов из личинок чёрная львинка *H. illucens* и изучении профилактического и терапевтического

потенциала антимикробных фракций пептидов при сальмонеллёзе цыплят. В выполнении диссертационных исследований нами были использованы микробиологические, физико-химические, клинические, гематологические, статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новый метод, позволяющий получить антимикробные пептиды, обладающие высокой антибактериальной активностью.
2. Физико-химические свойства антимикробных пептидов, полученных новым методом.
3. Оценка острой токсичности антимикробных пептидов.
4. Терапевтическая и профилактическая эффективность использования 20% раствора антимикробных пептидов.

Работа выполнена на кафедре микробиологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии Н.И. Вавилова».

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты исследований отличает высокая достоверность, обусловленная использованием значительного объема экспериментальных данных с подтверждением их методами математической статистики.

Диссертационная работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-26-00167 «Антимикробные пептиды насекомых: выделение, идентификация, доклинические и клинические испытания» (2022-2023 г.г.).

Материалы диссертации были представлены на конференциях Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения 2023», г. Саратов; V Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии – драйвер развития территорий» (Вологда, 20-21 апреля 2023); Международная научно-практическая конференция «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Московская обл., п. Биокомбинат, 29-30 ноября 2023); Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения 2024», г. Саратов.

Публикации. Основные результаты отражены в 4 публикациях, из них 2 статьи из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья, индексируемая в международной базе данных Scopus, 1 статья в других изданиях. Общий объем печатных листов составляет 2,0 п.л., лично соискателю принадлежит 1,7 печатных листов.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена Тычининым Н.Д. самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в подготовке, организации и осуществлении всех этапов диссертационной работы: постановке цели и задач, анализе источников литературы, проведении физико-химических, микробиологических, фармакологических и клинических методов исследования, а также обсуждении полученных результатов и их формулировке,

написании выводов, подготовке публикаций и апробации работы на научных конференциях различного уровня.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 135 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованных литературных источников, приложения. Список литературы представлен 217 источниками, в том числе 187 иностранными. Диссертационная работа включает 21 таблицу, 11 рисунков и 18 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в период с 2022 по 2025 год на базе на кафедре микробиологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии Н.И. Вавилова». Объектами для исследования служили личинки насекомого чёрная львинка *Hermetia illucens*, выращенные и культивируемые на базе лаборатории кафедры микробиологии и биотехнологии Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова.

В данном исследовании использовали следующие микроорганизмы, рода *Salmonella*: *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Abony* ГИСК 103/39 (*S. Abony*), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Infantis* Томск 1 (*S. Infantis*), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhimurium* 1626 (*S. Typhimurium*), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Enteritidis* 25 (*S. Enteritidis*).

Для получения бактериальной взвеси суточную культуру *S. Enteritidis* с соблюдением правил стерильности смывали с поверхности агара. Определение концентрации бактериальной взвеси определяли при помощи денситометра DEN-1 и набора готовых разведений для калибровки (BioSan, Латвия).

Личинки чёрной львинки, достигшие пятого возраста, иммунизировали инактивированной бактериальной взвесью *S. Enteritidis*. Иммунизацию проводили согласно методике, разработанной учёными Университета Лиссабона (Serrano I., et al., 2023).

После иммунизации личинок чёрной львинки получали композиции антимикробных пептидов по разработанному нами методу, заключающемуся в алгоритме последовательных этапов, включающих в себя выделение, очистку и идентификацию пептидов.

Содержание белка в исследуемых фракциях определяли по методу Лоури на спектрофотометре «ShimadzuUV-1280» (Shimadzu Corporation, Япония) при длине волны 450 нм (Lowry O. H. et al., 1951).

Для более четкой идентификации и изучения размера полученных пептидов после молекулярно-ситовой хроматографии проводили методом динамического рассеяния света (ДРС) на приборе Zetasizer (Malvern Instruments, Великобритания).

Для определения чувствительности к антибиотикам были отобраны следующие культуры микроорганизмов из музея кафедры микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВО Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова— *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*. Для этого использовали индикаторные диски для определения чувствительности микроорганизмов к лекарственным препаратам производства ООО «Нита-Фарм» (Россия) (Методические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2021). Определение устойчивости микроорганизмов рода *Salmonella* к антибиотикам выполняли согласно методическим указаниям 1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.

Изучение общетоксического действия антимикробных композиций на основе АМП проводили на белых мышах в соответствии с ГОСТ 32644-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности». Внутрижелудочное введение осуществляли при помощи желудочного зонда.

Для изучения профилактической и терапевтической эффективности композиции АМП отбирали цыплят после осмотра ветеринарного врача и бактериологического исследования. В эксперименте использовали цыплят-бройлеров кросса Кобб 500 в количестве 105 голов ($n=105$), всего 7 групп по 15 голов в каждой, данное количество животных было рациональным с точки зрения этических принципов и достаточным для обеспечения статистической достоверности исследования. Заражение всех групп цыплят проводили однократно, бульонной культурой *S. Enteritidis*, перорально в дозе 1 мл 1×10^7 КОЕ/мл. В процессе лечения в течение 5 дней проводили наблюдение за поведением и состоянием животных, оценку клинического статуса. Кровь для гематологического исследования отбирали у цыплят из подкрыльцовой вены путем прокола на 3 и 14 сутки после экспериментального заражения. Кожу по ходу вен дезинфицировали 70% раствором этилового спирта. Аспирацию крови осуществляли в вакуумные пробирки по 2 мл – в пробирки с антикоагулянтом К2 ЭДТА «ЮНИВЕТ» в модификации «ЮНИВЕТ-Пм» по ТУ 9398-033-59879815-2012. Сыворотки крови получали путем центрифугирования в течении 10 мин при 3000 об/мин.

Оценку эффективности профилактического и терапевтического действия антимикробных препаратов проводили на 5 сутки после курса лечения по клиническим признакам и микробиологическому исследованию.

Для бактериологического анализа использовали помёт, который получали из прямой кишки с помощью стерильных квачей.

Для идентификации сальмонелл применяли классические микробиологические методы, изучая морфологические, тинкториальные и биохимические свойства. Для изучения биохимических свойств использовали набор ЭНТЕРОтест 24 (стриппированный для идентификации энтеробактерий).

Серологическую идентификацию сальмонелл проводили с использованием набора реагентов «Сыворотки диагностические сальмонеллёзные адсорбированные О-поливалентные для реакции агглютинации, ЗАО "ЭКОлаб".

По окончании эксперимента изучали сохранность цыплят по группам, кроме этого, осуществляли анализ профилактической и терапевтической эффективности лечения.

Для статистической обработки данных применялись различные методы, в том числе вычисление средней арифметической абсолютной величины и относительной величины, коэффициент достоверности, ошибка средней арифметической, уровень значимости (P). Таблицы и диаграммы строились при помощи программы «Excel» на ПК (процессор 12th Gen Intel(R) Core (TM) i3-12100F 3.30 GHz) (Ашмарин, И.П. и др., 1962).

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка метода выделения пептидов из личинок чёрной львинки

Разработан метод выделения пептидов из личинок чёрной львинки. Предварительно личинки чёрной львинки пятого возраста были иммунизированы убитой взвесью *S. Enteritidis* с целью максимальной экспрессии антимикробных пептидов. Для эффективного выделения водорастворимых пептидов из биомассы личинок черной львинки *H. illucens* нами была разработана методика, состоящая из следующих этапов: замораживание, лиофилизация, гомогенизация, центрифугирование, повторное центрифугирование, фильтрация, лиофилизация, молекулярно-ситовая хроматография, лиофилизация.

Конечной стадией получения антимикробных пептидов, выделяемых из личинок чёрной львинки, было получение светлого мелкодисперсного порошка.

Анализ физико-химических свойств выделенных АМП

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), применяемый в наши дни в фармацевтической практике, был наиболее оптимальным способом для определения чистоты выделенных веществ, в том числе с невысокой температурой разложения. Элюентом при анализе выделенных пептидов выступал фосфатно-солевой буфер в виде раствора, так как было необходимо создать одинаковые условия для проведения хроматографирования по водородному показателю (его значение при анализе соответствовало $\text{pH}=7,4$). Для исследования использовали колонку BioSep-SEC-s2000. Используя данные о молекулярной массе белков, можно делать предположения о характеристике белков с применением метода хроматографии исключения размера (SEC) (Hong P., et al. 2012).

Для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии нами была подобрана оптимальная скорость потока элюента – 0,5 мл/мин, объем петли 71,2 мкл. Анализируя фракции белка, полученные без проведения предварительного этапа эксклюзионной хроматографии, был выявлен широкий спектр примесей (Рисунок 1).

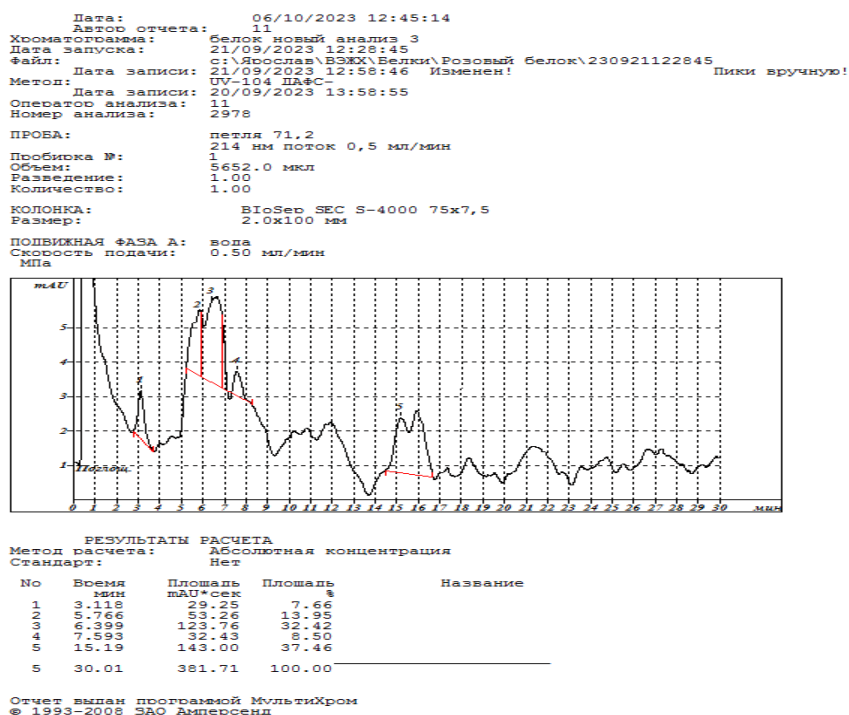


Рисунок 1 – Хроматограмма белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *H. illucens* без проведения этапа эксклюзионной хроматографии

Однако, использование предварительного этапа эксклюзионной хроматографии позволило получить смесь трех пептидов с молекулярной массой от 3,5 до 7 кДа с различием в хроматографическом времени удерживания менее 1 мин. Полученные данные были подтверждены тремя параллельными экспериментами по выделению и очистке пептидов из аналогичной биомассы личинок (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика хроматограмм анализируемых белковых фракций

№ образ-ца	Время удерживания белковой фракции №, мин			Площадь пика белковой фракции №, mAU*сек		
	1	2	3	1	2	3
1	3,02	3,85	4,33	96,4	65,36	148,53
2	3,06	4,28	5,76	81,58	56,39	234,54
3	3,16	5,18	5,83	46,94	112,38	92,35
M±m	3,08±0,08	4,44±0,77	5,31±0,96	74,97±28,72	78,04±34,03	158,47±81,04

Анализируя полученные нами данные, регистрировали сходные значения во времени удерживания белковых фракций 1 и 2, вместе с тем белковые

фракции 2 и 3 имели меньшую разницу во времени удерживания, в этой связи полного разделения хроматографических пиков не происходило при проведении эксперимента в трех повторностях. Учитывая, вышесказанное, для оптимизации процесса нами было принято решение не разделять белковые фракции методом ВЭЖХ с различным временем удерживания из-за сходных физико- химических свойств, а далее проводить анализ белковых фракций методом динамического рассеяния света.

Таблица 2 – Соотношение хроматографических выходов, %

№ образца	Хроматографический выход, %		
	1	2	3
Белковая фракция, №			
1	31,07	21,06	47,87
2	21,90	15,14	62,96
3	18,65	44,65	36,69
M±	24±7	27±18	49±15

Сопоставление данных хроматографического выхода пептидов с площадью пиков белковых фракций позволяет предположить, что разработанный нами метод позволит получать пептиды одинакового размера, что в сочетании с методом динамического рассеяния света позволит достоверно анализировать полученные пептиды на наличие примесей и определять их размер (Хлебцов Б. Н., и др., 2017).

Размер белковых фракций определяли методом динамического рассеяния света. По результатам было выявлено, что размер белковой фракции 1 составил 68 - 141 нм; фракция 2 имела размер 37 - 79 нм, 3 белковая фракция – 43 нм - 122 нм (Рисунок 2-4). В подтверждение того, что полученные вещества являются белками проводили анализ методом Лоури и подтвердили, что чистота белка составляла 93-97 %.

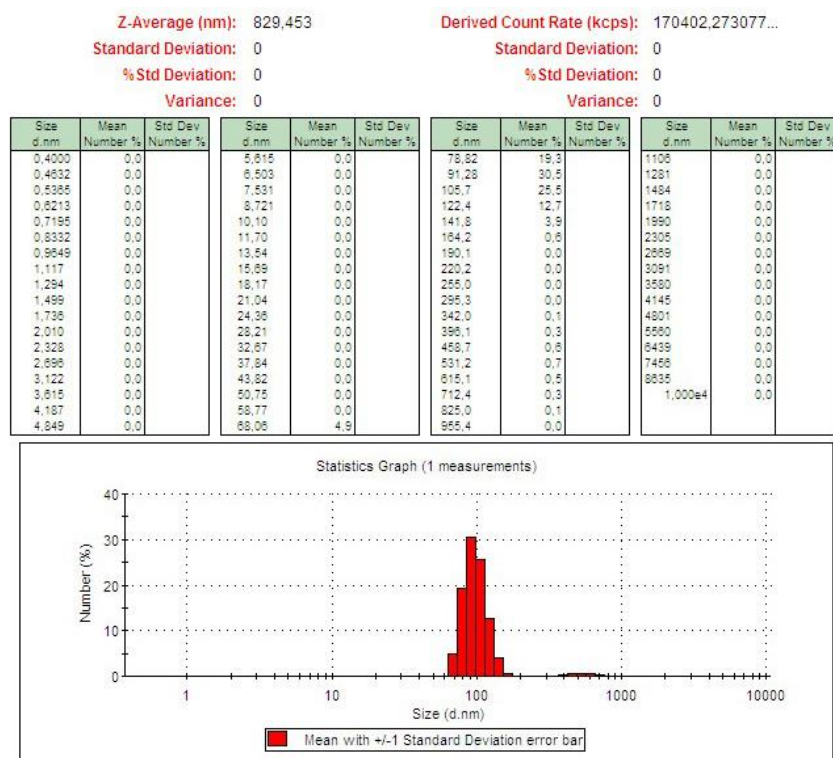


Рисунок 2 – Изучение белковой фракции 1, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС

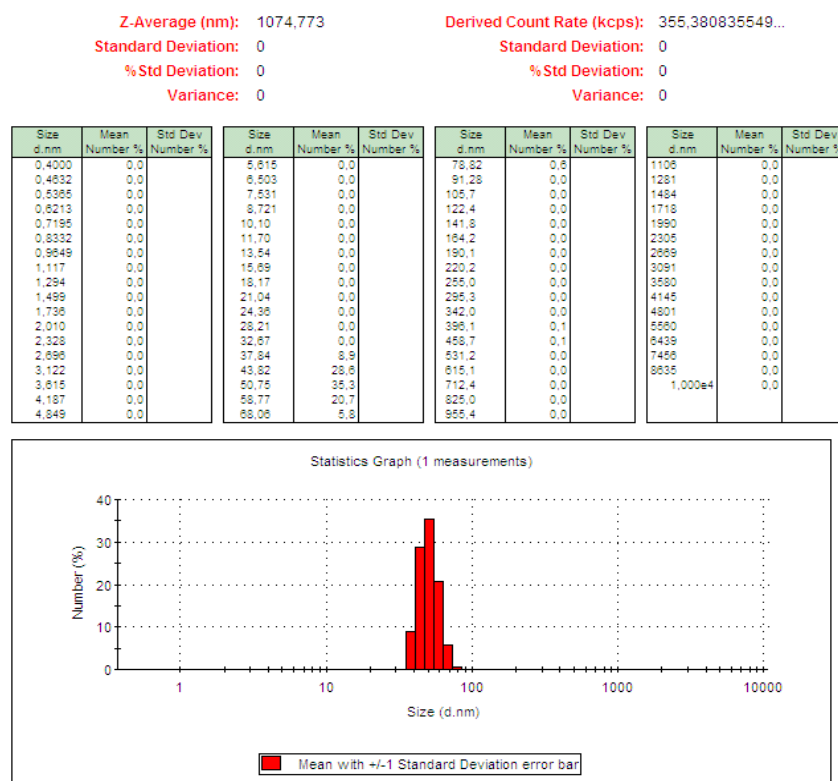


Рисунок 3 – Изучение белковой фракции 2, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС

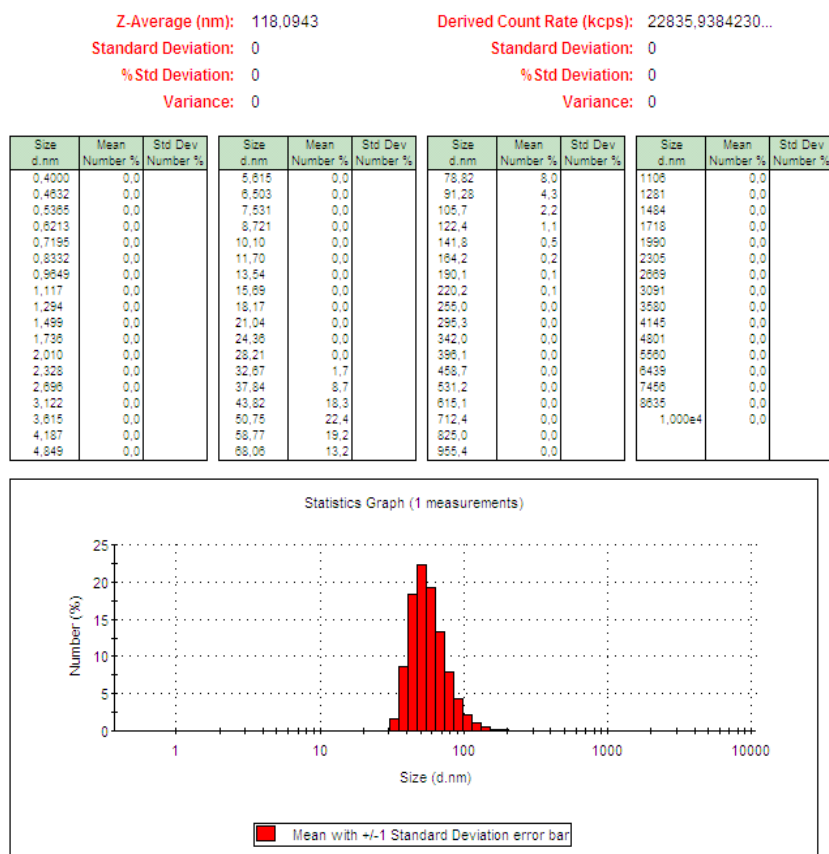


Рисунок 4 – Изучение белковой фракции 3, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС

Таким образом, нами доказана воспроизводимость разработанного нами способа получения антимикробных пептидов из личинок насекомых, предложенный нами алгоритм получения и очистки пептидов, включающий в себя холодную экстракцию в дистиллированной воде, стадии очистки белков, высаливание и молекулярно-ситовую хроматографию в сочетании с методом ДРС позволит достоверно идентифицировать выделенные пептиды и производить данные антимикробные субстанции в промышленных масштабах по низкой себестоимости.

Изучение чувствительности штаммов рода *Salmonella* к антибактериальным препаратам

Для исследования были отобраны следующие штаммы микроорганизмы рода *Salmonella*: *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*.

В результате проведения исследований отобранных нами штаммов на чувствительность к 8 фармакологическим группам антибиотиков (цефалоспорином, аминогликазидом, макролидом и азалидом, пенициллинам, карбапенемам, фторхинолоном, противогрибковым средствам, антибиотикам полициклической природы) была выявлена множественная антимикробная резистентность всех изученных нами штаммов.

Вместе с тем, удалось выявить несколько антимикробных препаратов высокоэффективных в отношении штаммов *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*. Так, штамм *S. Abony* продемонстрировал чувствительность к цефепиму, *S. Infantis* – к амикацину, *S. Enteritidis* – к цефепиму и амикацину. Штамм *S. Typhimurium* был умеренно чувствителен к цефуросиму и амикацину. Однако следует отметить, что все изученные нами штаммы оказались в той или иной степени чувствительны к действию энрофлоксацина.

Анализируя полученные данные для изучения эффективности применения антимикробных пептидов при сальмонеллезе цыплят в качестве опытного штамма нами был выбран *S. Enteritidis*, который продемонстрировал высокую устойчивость к большинству изученных нами антибактериальных препаратов, а также ввиду широкой распространенности инфекций и эпизоотической важности заболеваний, вызываемых этим штаммом данного микроорганизма.

Оценка острой токсичности полученных пептидов

Для определения безопасности использования АМП в качестве профилактических или терапевтических средств определяли значение острой токсичности (LD_{50}). Для эксперимента использовались здоровые белые лабораторные мыши с массой тела 18-20 г.

Для исследования готовили раствор антимикробных пептидов с массовой долей 20% (200 мг/мл). Данная концентрация позволяет ввести животному максимально необходимую дозу действующего вещества, в максимально допустимом объеме с целью введения в желудок – 0,5 мл.

В ходе предварительного эксперимента дозы 5 мг/кг, 50 мг/кг, 300 мг/кг и 2000 мг/кг довели до адекватных объемов тем же растворителем, что и основного раствора.

В ходе предварительного эксперимента у подопытных мышей падежа и признаков интоксикации не наблюдалось.

При проведении основного эксперимента согласно ГОСТ 32644-2014, доза 5000 мг/кг по действующему веществу, была введена вначале одному животному. В ходе наблюдения за ним гибели и признаков интоксикации не наблюдалось. Поэтому данную дозу ввели двум оставшимся мышам. В ходе наблюдения за которыми, также внешних изменений физиологического состояния выявлено не было. За состоянием животных следили 14 дней. У подопытных животных не было обнаружено нарушений функционирования ЖКТ, гиподинамии, гиперемии кожных покровов или апноэ.

Таким образом, можно заключить, что LD_{50} более 5000 мг/кг, дальнейшие исследования считаются не целесообразными по этическим нормам, а антимикробные пептиды можно отнести к 5 классу опасности.

Изучение действия антимикробных пептидов при профилактике и лечении сальмонеллеза цыплят

Экспериментальное заражение цыплят проводили согласно схеме. Для изучения профилактического и терапевтического действия использовали

антимикробную композицию на основе 20% раствора АМП, полученную из иммунизированных личинок *H. illucens*, в количестве 1 мл в течение 5 дней и энрофлоксацин согласно инструкции, перорально с водой для поения в дозе 0,5 мл на 1 л воды в течение 5 дней. Лечение второй, третьей, четвертой и пятой группы животных начинали при появлении первых клинических признаков заболевания.

С профилактической целью первой группе (n=15) выпаивали антимикробную композицию перорально ежедневно в течение недели, предшествующей эксперименту. С терапевтической целью второй (n=15) опытной группе данную композицию вводили орально; третьей группе (n=15) – внутривентрикулярно; четвертой группе (n=15) давали 20% антимикробную композицию перорально + энрофлоксацин согласно инструкции; пятая группа (n=15) получала энрофлоксацин согласно инструкции. Шестая группа (n=15) была контрольной (положительный контроль). Седьмая группа – интактная (отрицательный контроль).

После заражения всех групп животных на 3-4 сутки отмечали появление клинических признаков заболевания в виде потери аппетита, угнетенного состояния, диареи с пометом светло-зеленого цвета. На третий день после начала лечения у испытуемых животных отмечали улучшение аппетита и общего состояния. Клиническое выздоровление испытуемых животных подтверждали классическими микробиологическими методами, а именно отсутствием возбудителя в пробах помёта цыплят и гематологическими исследованиями.

Температура тела испытуемых животных в первые два дня после заражения была незначительно повышена. Вместе с тем, в следующие три дня наблюдений температура тела цыплят находилась в пределах физиологической нормы (Рисунок 5, Таблица 3).

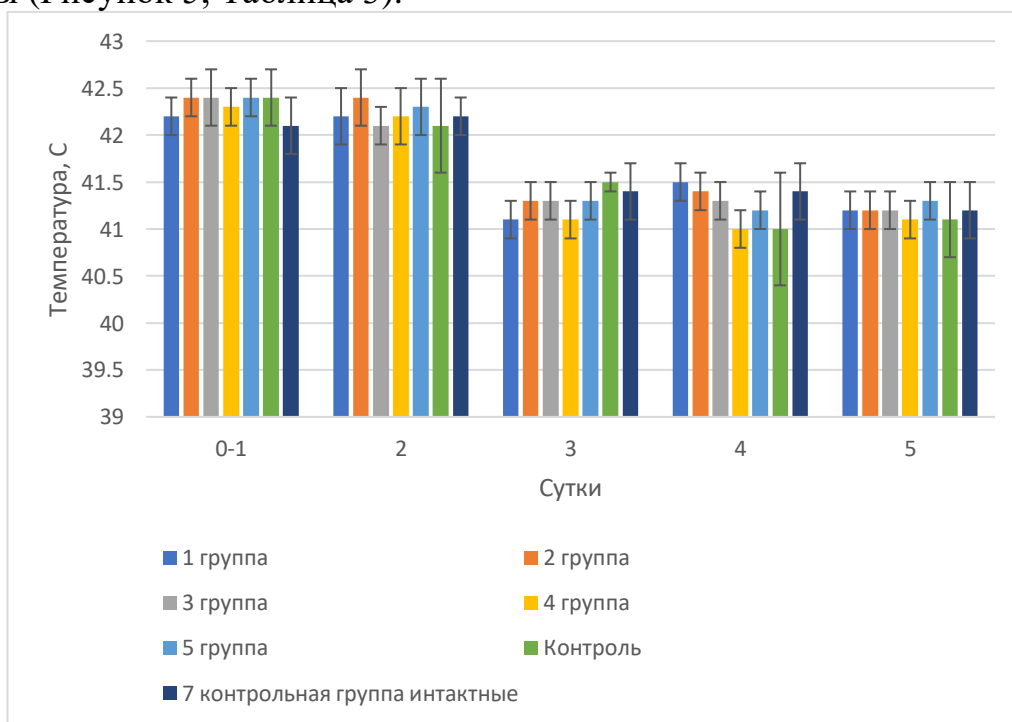


Рисунок 5 – Динамика температуры тела подопытных цыплят

Таблица 3 – Динамика температуры тела цыплят - бройлеров

№ группы	Температура тела ($^{\circ}\text{C}$) в ходе эксперимента (сутки)					Норма
	0-1	2	3	4	5	
1 опытная	41,3 \pm 0,1	41,2 \pm 0,2	41,1 \pm 0,2	41,5 \pm 0,2	41,2 \pm 0,2 ^(**)	40-42
2 опытная	42,4 \pm 0,2*	42,4 \pm 0,3*	41,3 \pm 0,2 ^(**)	41,4 \pm 0,2 ^(**)	41,2 \pm 0,2 ^(**)	
3 опытная	42,4 \pm 0,3*	42,1 \pm 0,2*	41,3 \pm 0,2 ^(**)	41,3 \pm 0,2 ^(**)	41,2 \pm 0,2 ^(**)	
4 опытная	42,3 \pm 0,2*	42,2 \pm 0,3*	41,1 \pm 0,2 ^(**)	41 \pm 0,2 ^(**)	41,1 \pm 0,2 ^(**)	
5 опытная	42,4 \pm 0,2*	42,3 \pm 0,3*	41,3 \pm 0,2 ^(**)	41,2 \pm 0,2 ^(**)	41,3 \pm 0,2 ^(**)	
6 контрольная	42,4 \pm 0,3*	42,1 \pm 0,5*	41,5	40,7	40,9	
7 контрольная	41,3 \pm 0,2	41,3 \pm 0,2	41,1 \pm 0,2	41,50 \pm 0,2	41,2 \pm 0,2	

Примечание: * различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при $t = 2,10$); ^(**) - различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой до введения препарата, относительно опытной группы через 14 суток после введения препарата ($P \leq 0,05$ при $t = 2,10$)

При анализе гематологических показателей крови установлено достоверное повышение общего количества лейкоцитов во 2-6 группах птиц после заражения, относительно 7 интактной группы цыплят. Повышение лейкоцитов отмечалось за счет псевдоэозинофилов, что указывает на развитие инфекционного процесса, вызванного *S. Enteritidis* (Рисунок 6). Наряду с этим, в опытных группах цыплят после заражения отмечается достоверное снижение гемоглобина на фоне повышения СОЭ, при отсутствии динамики изменений общего количества эритроцитов периферической крови (Рисунок 7-8). Данный факт указывает на гемолитический характер анемии, на фоне интоксикации организма продуктами метаболизма сальмонелл и обезвоживание организма, связанного с диарейным синдромом.

Вместе с этим, в первой группе цыплят, которым за 7 дней до заражения выпаивали антимикробную композицию на основе 20% раствора АМП, динамика изменений общего количества лейкоцитов и лейкограммы периферической крови отсутствовала.

Гематологические показатели оставались неизменными, как на третьи, так и на 14 сутки после заражения бактериальной взвесью *S. Enteritidis*. Гематологические показатели этой группы цыплят находились на уровне и не имели достоверных отличий от показателей седьмой интактной группы цыплят.

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что в первой группе цыплятам которой использовали 20% раствор АМП перорально в течении 7 дней до заражения, регистрировали 93,3% эффективность данной профилактики. Во 2 группе из 14 заболевших животных, выздоровело 8, пало 6, таким образом было установлено, что пероральное применение 20% раствора АМП с начала появления клинических признаков заболевания гарантировало эффективность 53,3 %.

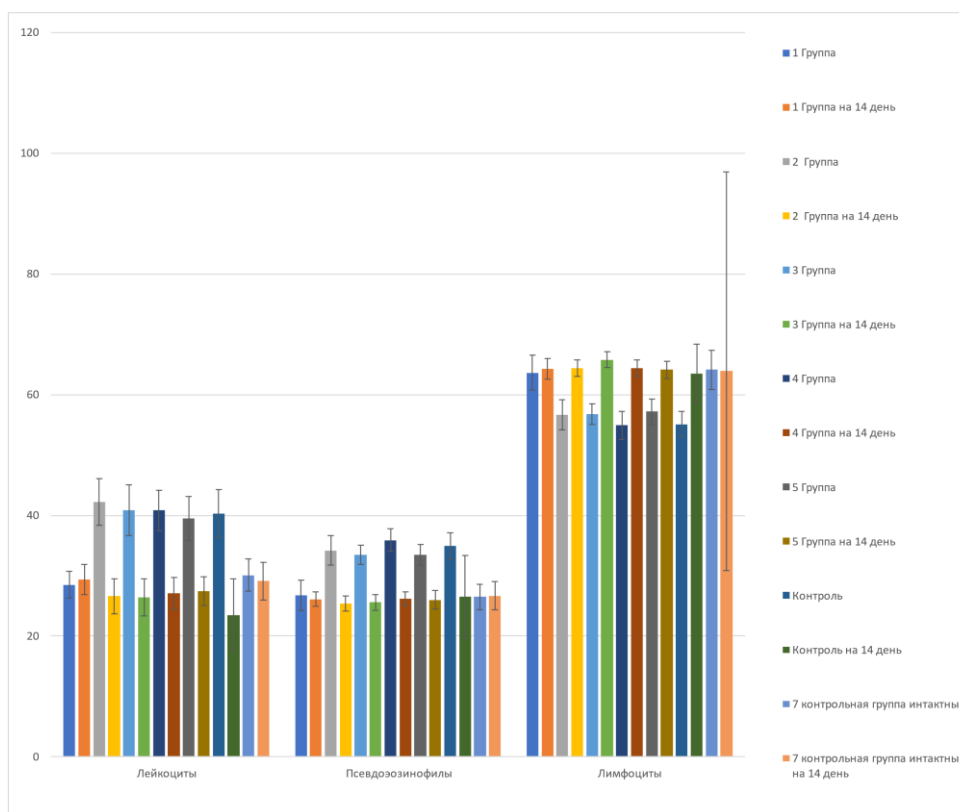


Рисунок 6 – Гематологические показатели подопытных групп цыплят и контроля по (лейкоциты, псевдоэозинофилы и лимфоциты)

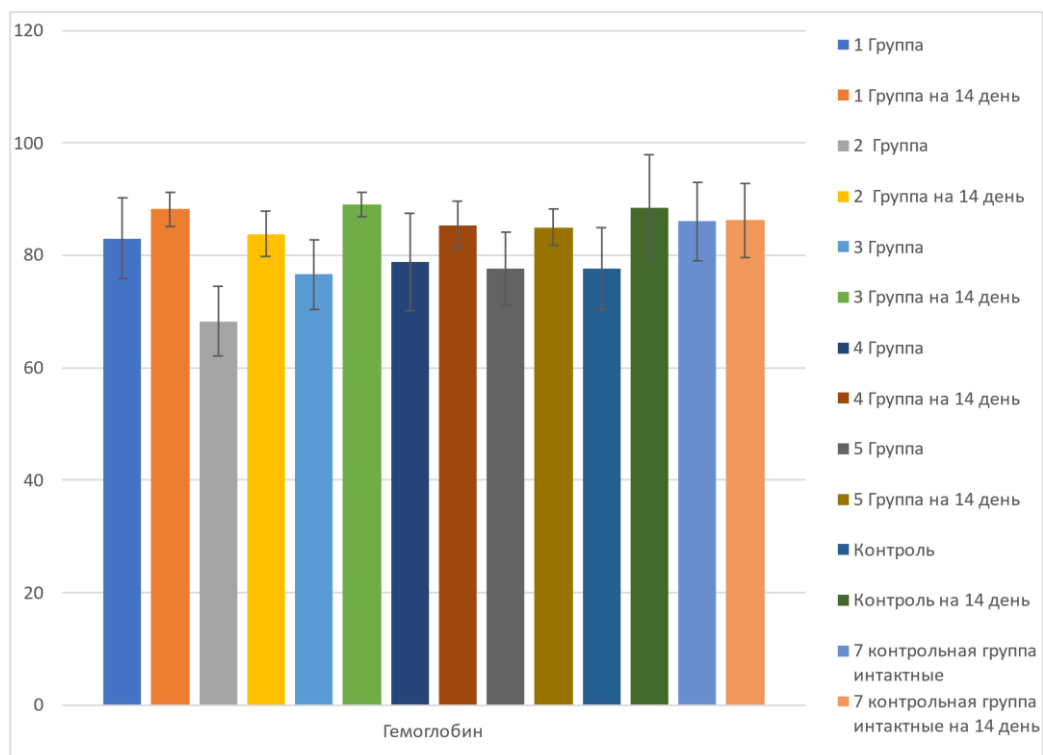


Рисунок 7 – Гематологические показатели подопытных групп цыплят (гемоглобин)

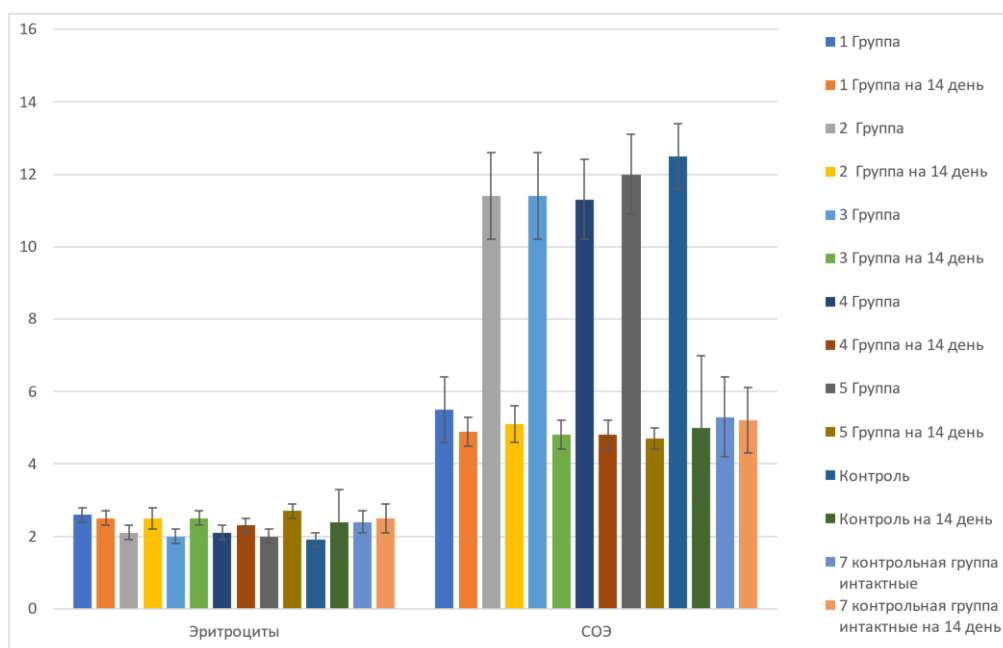


Рисунок 8 – Гематологические показатели подопытных групп цыплят (эритроциты и СОЭ)

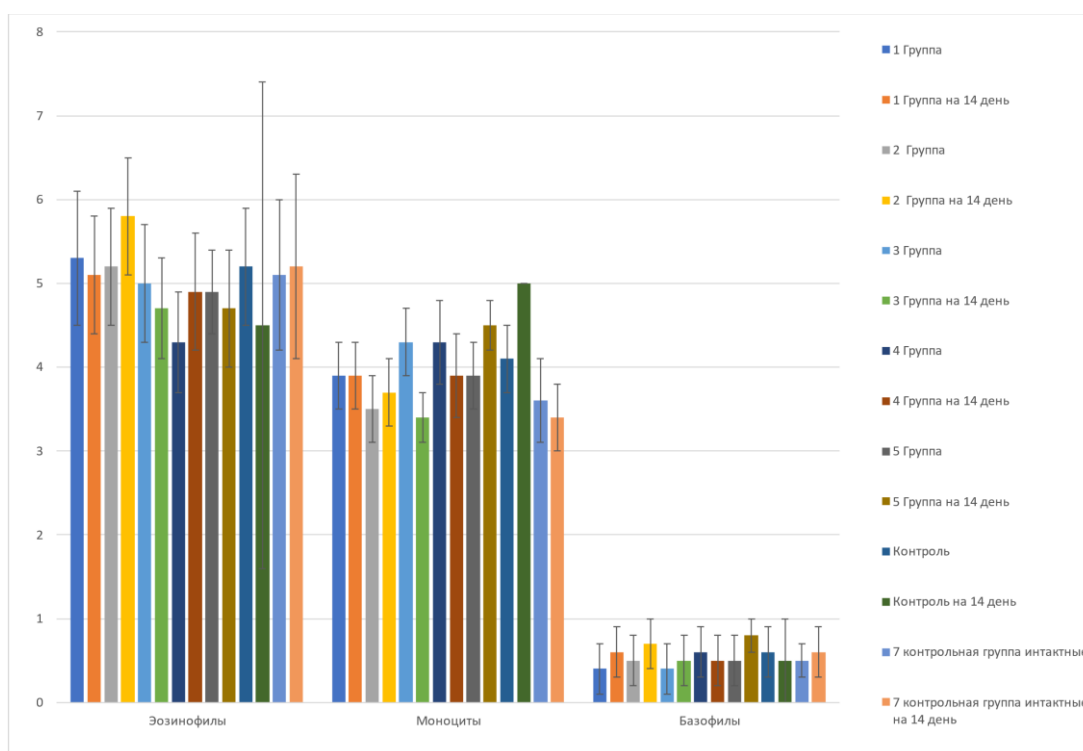


Рисунок 9 – Гематологические показатели подопытных групп цыплят (эозинофилы, моноциты и базофилы)

При парентеральном введении (3 опытная группа) исследуемого раствора АМП из 14 заболевших животных, 10 выздоровело, 4 пало, таким образом, это эффективность использования испытуемой антимикробной композиции составила 66,7%. Пероральное использование 20% антимикробной композиции на основе АМП сочетано с энрофлоксацином (4 группа) обеспечивало эффективность лечения на уровне 93,3%; при применении энрофлоксацина рег

ос согласно инструкции, отмечали 80 % эффективность. В контрольной группе цыплят, которым после заражения лечебных мероприятий не проводилось, выжило 2 головы. Гематологические показатели у данных птиц, через 2 недели после заражения находились в пределах физиологических значений. Данный факт связан с индивидуальной резистентностью организма выживших животных. Кроме этого, следует отметить, что у выживших животных среди опытных групп гематологические показатели достигали физиологических значений для данного вида и кросса, а также не имели достоверных отличий от интактной группы цыплят, спустя 14 суток после проведения лечебных мероприятий.

Таблица 4 – Изучение профилактического и терапевтического эффекта классических и альтернативных антибактериальных препаратов при сальмонеллезе цыплят

Группы Физиологическое состояние	1 опытная группа АМП орально за 7 суток, голов (n=15)	2 опытная группа АМП орально, голов (n=15)	3 опытная группа АМП инъекционно, голов (n=15)	4 опытная группа АМП+ ЭНФ, голов (n=15)	5 опытная группа ЭНФ, голов (n=15)	6 Конт- роль, голов (n=15)	7 Контроль (интактные), голов (n=15)
Заболело	1	14	14	15	15	14	15
Выздоровело	0	8	10	14	12	1	0
Пало	1	6	4	1	3	13	0
Эффективность, %	93,3	53,3	66,7	93,3	80,0	6,7	

В опытных группах цыплят, через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий, у выживших животных, гематологические показатели достигали физиологических значений и не отличались от птиц седьмой (интактной) группы. Для подтверждения эффективности лечения были произведены высеивания из помета цыплят после лечения и было выявлено отсутствие *S. Enteritidis* классическими микробиологическими методами.

Таким образом, установлена эффективность на уровне 93,3 % для лечения сальмонеллеза цыплят, обусловленная сочетанным пероральным введением 20 % раствора антимикробных пептидов в количестве 1 мл в течение 5 дней и энрофлоксацина перорально с водой для поения в дозе 0,5 мл на 1 л воды в течение 5 дней. Терапевтическое действие такого лечения по эффективности можно сравнить с профилактическим влиянием при использовании анализируемой композиции АМП перорально в течение 7 дней, предшествующих заражению. Полученные нами данные демонстрируют достаточно высокую профилактическую и терапевтическую эффективность анализируемого 20 % раствора АМП.

Результаты проведенных нами исследований позволяют рекомендовать использование 20% раствора АМП в комплексных лечебно-профилактических и оздоровительных мероприятиях при сальмонеллезной инфекции у цыплят. На основании экспериментальных исследований можно констатировать, что анализируемая антимикробная композиция на основе АМП в рекомендуемых дозах обладает высокой активностью против *Salmonella Enteritidis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных нами исследований апробирована методика иммунизации личинок *H. illucens*, разработан новый метод выделения антимикробных пептидов из биомассы иммунизированных личинок, представляющий собой алгоритм последовательных этапов, включающих в себя выделение, очистку и идентификацию пептидов. Изучена эффективность использования антимикробных композиций пептидов для профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят. Доказано, что 20% раствор АМП обладают высокой противомикробной активностью к штамму *S. Enteritidis*, обладающему множественной устойчивостью к действию классических антимикробных препаратов.

1. Установлено, что при профилактике сальмонеллеза цыплят эффективность применения композиции антимикробных пептидов составила 93,3%.
2. Терапевтическая эффективность лечения сальмонеллеза цыплят при внутрибрюшинном введении АМП составила 66,7 %; при лечении энрофлоксацином 80%, при сочетанной терапии энрофлоксацином и АМП – 93,3%.
3. Разработан новый метод получения водорастворимых пептидов из личинок *H. illucens*, который в сочетании с холодной экстракцией и стадиями высаливания и очистки белков с последующей молекулярно-ситовой хроматографией позволяет в дополнении с методом динамического рассеяния света достоверно идентифицировать получаемые пептиды.
4. Апробирован метод динамического рассеяния света для определения размера пептидов. Было установлено, что размер 1 фракции составил 68 - 141 нм; 2 фракции – 37 - 79 нм, 3 фракции – 43 нм - 122 нм.
5. Выделенные нами антимикробные пептиды относятся к 5 классу опасности (вещества малоопасные).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Полученные нами антимикробные пептиды показали высокую профилактическую и терапевтическую эффективность при лечении сальмонеллеза цыплят, вызванного антибиотикорезистентными штаммами, и могут быть рекомендованы для разработки противомикробных средств нового поколения. Для профилактики сальмонеллеза цыплят рекомендовано

пероральное использование 20% раствора АМП в течение 7 суток. С терапевтической целью предложено сочетанное использование 20 % раствора АМП перорально в количестве 1 мл в течении 5 дней и энрофлоксацина согласно инструкции, перорально с водой для поения в дозе 0,5 мл на 1 л воды в течение 5 дней.

2. Для получения антимикробной композиции рекомендуется использовать личинки насекомого *Hermetia illucens*. Для увеличения экспрессии антимикробных пептидов в гемолимфу насекомых, предварительно следует проводить иммунизацию личинок *H. illucens* пятого возраста в последний левый сегмент брюшной полости, подготовленной взвесью инактивированной культуры *S. Enteritidis* с концентрацией микроорганизмов 10^8 КОЕ/мл в количестве 5 мкл.

3. Метод, разработанный нами, предлагается использовать для выделения антимикробных композиций пептидов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В результате проведенных исследований была подтверждена перспектива использования насекомых в качестве сырья для получения АМП. Это особенно актуально для проведения антимикробной терапии при лечении сальмонеллезной инфекции у цыплят, вызванной антибиотикорезистентными штаммами. Антимикробные композиции пептидов, полученные нами, показали высокую эффективность при профилактике и лечении сальмонеллеза цыплят. Перспектива разработки темы данного исследования заключается в поиске и создании оптимальных лекарственных форм АМП и совершенствовании мер профилактики и лечения сальмонеллеза у других видов сельскохозяйственных животных, в особенности молодняка.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России:

1. Антимикробные пептиды и перспектива их использования в ветеринарии / О.С. Ларионова, Я.Б. Древко, Е.К. Ремизов, Н.Д. Тычинин, Л.С. Крылова, С.В. Ларионов // Ветеринария. – 2023. – Т. № 12. – С. 31-34.

2. Профилактическая и терапевтическая эффективность антимикробных пептидов при сальмонеллезе цыплят /Н.Д. Тычинин, Я.Б. Древко, С.В. Козлов, О.С. Ларионова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2025. – 9 (251). – С. 61-71.

Журналы, индексируемые в базе данных Scopus:

3. Оптимизация методов выделения и идентификации пептидов, выделенных из личинок *Hermetia illucens* / О.С. Ларионова, Я.Б. Древко, Н.Д. Тычинин, Л.С.

Крылова, Б.И. Древко, С.В. Ларионов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. – 2024. – Т. 24. № 2. – С. 150-160.

В материалах конференций, семинаров в других изданиях:

4. Потенциал применения антимикробных пептидов, полученных из биомассы личинок *Hermetia illucens* / Н.Д. Тычинин, В.Н. Нечаев, И.С. Попрыгина, В.А. Василенко, К.А. Лутохина, Ю.В. Макарова, К.Ю. Нечаева // В сборнике: Зыкинские чтения. Материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина. Саратов. – 2023. – С. 209-214.