

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
Кафедра анатомии и физиологии человека и животных

Заведующий кафедрой
канд. биол. наук, доцент
_____ А. В. Елифанов

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
магистерская диссертация

АКТИВНОСТЬ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ У ХЛОРФЕНАПИР-РЕЗИСТЕНТНОЙ ЛИНИИ
MUSCA DOMESTICA L.

06.04.01

Магистерская программа «Биотехнология»

Выполнила работу
студентка 2 курса
очной формы обучения

Кинарейкина
Анна
Григорьевна

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент

Кыров
Дмитрий
Николаевич

Рецензент
канд.биол.наук, научный сотрудник
лаборатории биохимии адаптивности
насекомых Института биохимии и
генетики УФИЦ РАН

Соколянская
Марина
Павловна

Тюмень
2022

АННОТАЦИЯ

79 с., библиограф. 126, рис. 13, табл. 7, прилож. 6.

[изъято 2 абзаца]

По материалам выпускной квалификационной работы опубликована статья в журнале, входящем в перечень ВАК и RSCI, а также статья в сборнике материалов конференции.

Ключевые слова: комнатная муха (*Musca domestica* L.), инсектициды, хлорфенапир, фипронил, резистентность, ацетилхолинэстераза, неспецифические эстеразы.

ANNOTATION

79 pages, literature 126, illustration 13, tables 7, applications 6.

[изъято 2 абзаца]

Based on the materials of the graduate qualification work published the article in the journal, which included in the VAK list and RSCI and in the collection of conference materials.

Keywords: housefly (*Musca domestica* L.), insecticides, chlorfenapyr, fipronil, resistance, acetylcholinesterase, non-specific esterases.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1. ХИМИЧЕСКАЯ БОРЬБА С НАСЕКОМЫМИ	10
2. ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСЕКТИЦИДАМ	16
2.1. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ	16
2.1.1. ЭСТЕРАЗЫ	18
2.1.1.1. КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗА	19
2.1.1.2. АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА	20
2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.2. ПОЛУЧЕНИЕ ХЛОРФЕНАПИР-РЕЗИСТЕНТНОЙ ЛИНИИ <i>MUSCA DOMESTICA L.</i>	Ошибка! Закладка не определена.
2.3. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНСЕКТИЦИДОВ НА ИМАГО ЛАБОРАТОРНОЙ И РЕЗИСТЕНТНОЙ ЛИНИИ <i>MUSCA DOMESTICA L.</i>	Ошибка! Закладка не определена.
2.4. ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ И ИНСЕКТИЦИДЫ	Ошибка! Закладка не определена.
2.5. МЕТОДИКА ГОМОГЕНИЗАЦИИ	Ошибка! Закладка не определена.
2.6. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ (ПО ЭЛЛМАНУ)	Ошибка! Закладка не определена.
2.7. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ	Ошибка! Закладка не определена.
2.8. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ	Ошибка! Закладка не определена.
2.9. МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА (ПО ЛОУРИ)	31
2.10. СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ	33

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	35
ВЫВОДЫ	39
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ЦНС – центральная нервная система;
- ACh – ацетилхолин;
- ChEs – холинэстеразы;
- АХЭ, AChE – ацетилхолинэстераза;
- GPI – гликолфосфатидилинозитоловый якорь;
- КЭ, CarEs, CarE, CCE – карбоксилэстераза;
- GST – глутатион-S-трансфераза;
- ФОС – фосфорорганические соединения;
- КМ – карбаматы;
- DEF – S.S.S-трибутилфосфотритиоат;
- IRAC – Комитет по контролю резистентности к инсектицидам;
- ЛД50, СД50, СК50, LC50 – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы;
- Лаб – чувствительная линия *Musca domestica* L.;
- СИХ – хлорфенапир-резистентная линия *Musca domestica* L.

ВВЕДЕНИЕ

Комнатная муха *Musca domestica* L. относится к отряду двукрылых, семейству *Muscidae* [Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328]. Это высококомобильный космополитичный вид, имеющий важное санитарное значение в медицине [Qiu, Pan, Li et al., p. 202; Farooq, Freed, p. 28; Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328] и ветеринарии [Ahmadi, Khajehali, p. 345; You, Shan, Xin et al., p. 2; You, Li, Yin et al., p. 2]. *M. domestica* является механическим переносчиком примерно 200 патогенов [Li, Huang, Yuan, p. 312; Qu, Zhu, Li et al., p. 2339] человека и животных [Baskurt, Taskin, Dogac et al., p. 249; Ahmadi, Khajehali, p. 345; You, Shan, Ma et al., p. 4322; Riaz, Zahoor, Malik et al., p. 2; Abobakr, Al-Hussein, Bayoumi et al., p. 4] в жилых, коммерческих, животноводческих и птицеводческих помещениях [Ahmadi, Khajehali, p. 345], включая бактериальную дизентерию, холеру, шигеллез, птичий грипп и сальмонеллез [Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328], стафилококк, энтерококк, кишечную палочку, брюшной тиф, туберкулёз, офтальмию, сибирскую язву и др. [Riaz, Zahoor, Malik et al., p. 2], в том числе бактерий устойчивых к антибиотикам [Qiu, Pan, Li et al., p. 202].

Комнатная муха – это экономическая проблема для фермерских хозяйств, поскольку животные тратят дополнительную энергию на борьбу с насекомыми [Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328], что приводит к снижению производства яиц, молока, снижению конверсии корма [Wang, Li, Pan et al., p. 154; Riaz, Zahoor, Malik et al., p. 2]. Это указывает на необходимость применения инсектицидов в современном сельском хозяйстве для борьбы с вредителями (в том числе и комнатной мухой) [Lang, Shang, Chen et al., p. 1796]. Но часто возникает проблема из-за нерационального использования инсектицидов – развитие резистентности, которая ведет к увеличению доз, частоты применения препаратов [Ahmadi, Khajehali, p. 345].

В настоящее время достигнут прогресс в понимании механизмов резистентности к широко применяемым инсектицидам: пиретроидам, фосфорорганическим, хлорорганическим соединениям, неоникотиноидам, спиносидам, пиразолам [Qayyum, Wakil, Arif et al., p. 287]. Но применение относительно новых и менее распространённых инсектицидов, таких как хлорфенапир, фипронил также вызывает появление устойчивых к ним популяций насекомых-вредителей, однако точный механизм формирования резистентности к ним полностью не установлен, поэтому тема является актуальной.

Кинетические параметры (K_m , V_{max}) АХЭ у *M. domestica* изучались в лабораторных условиях в модельных экспериментах путем их определения после воздействия инсектицидов (хлорфенапира, фипронила) на хлорфенапир-селектированную / резистентную (СИХ) линию *M. domestica* и сравнения результатов с аналогичными параметрами высокочувствительной линии (Лаб). Также были изучены системы детоксикации и молекулярные мишени инсектицидов, в частности ацетилхолинэстераза и неспецифические эстеразы.

Цель работы – изучение активности эстераз и кинетических параметров ацетилхолинэстеразы у линии *Musca domestica*, резистентной к хлорфенапиру.

В связи с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

1. Определить неспецифическую и специфическую эстеразную активность у имаго чувствительной и хлорфенапир-резистентной линий *Musca domestica*;

2. Определить кинетические параметры (K_m , V_{max}) ацетилхолинэстеразы у имаго чувствительной и хлорфенапир-резистентной линий *Musca domestica*;

3. Изучить влияние хлорфенапира и фипронила в сублетальных дозах на активность неспецифической эстеразы у имаго чувствительной и хлорфенапир-резистентной линий *Musca domestica*;

4. Изучить влияние хлорфенапира и фипронила в сублетальных дозах на активность и кинетические параметры (K_m , V_{max}) ацетилхолинэстеразы у имаго чувствительной и хлорфенапир-резистентной линий *Musca domestica*;

5. Выполнить сравнительный анализ полученных данных в зависимости от пола насекомых и дозы инсектицида.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. ХИМИЧЕСКАЯ БОРЬБА С НАСЕКОМЫМИ

Химический контроль практикуется как основной метод контроля насекомых примерно с 1950-х годов [Kakani, Sagri, Omirou et al., p. 744; Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328]. Сейчас же среди методов борьбы наиболее распространенным является применение пестицидов [Qiu, Pan, Li et al., p. 202; Riaz, Zahoor, Malik et al., p. 2; You, Li, Yin et al., p. 2], за последние несколько десятилетий при постоянном росте мирового производства продовольствия использование пестицидов в сельском хозяйстве увеличилось [Casu, Tardelli, de Marchi et al., p. 884]. Например, в Бразилии рынок пестицидов значительно расширился за последнее десятилетие (190%) [Freitas, Santos, Sarcinelli et al., p. 2]; по оценкам BusinesStat, в 2017-2021 гг производство пестицидов в России увеличилось в 1,7 раза: с 86,8 тыс т до 148,9 тыс т, доля инсектицидов к 2021 г составляла 12,5% [BusinesStat; электронный ресурс].

Использование инсектицидов в сельском хозяйстве очень важно для повышения урожайности сельскохозяйственных культур [Isik, p. 4624]. Однако интенсивное использование этих химических веществ, остаточные опрыскивания, увеличение применяемых доз, быстрый жизненный цикл сельскохозяйственных растений и животных дают высокий потенциал для отбора устойчивости к ним [Kristensen, Knorr, Spencer et al., p. 1789; Riaz, Zahoor, Malik et al., p. 2] (в том числе и у *M. domestica* [Qiu, Pan, Li et al., p. 202; Li, Huang, Yuan, p. 312]).

К тому же пестициды способны распространяться на расстояние от нескольких ярдов до нескольких сотен миль, что составляет от 2 до 25% потерь химического вещества [Casu, Tardelli, de Marchi et al., p. 884], что приводит к большему антропогенному рассеиванию в окружающей среде [Freitas, Santos, Sarcinelli et al., p. 2], накоплению в почве, воде и воздухе [Karmaz, Ozkan, Yetim

et al., p. 2916], это в последующем может привести к значительным рискам загрязнения окружающей среды [Farooq M., Freed S., 2018; Ahmadi, Khajehali, p. 345; Riaz, Zahoor, Malik et al., p. 2] и, соответственно, к потенциально опасным последствиям для здоровья людей, животных [Marimuthu, Lee, Kim et al., p. 308; Casu, Tardelli, de Marchi et al., p. 884; Isik, p. 4624; Omwenga, Zhao, Kanja et al., p. 1289; Giacoppo, Franca, Kuca et al., p. 2049], угрозе в том числе и для нецелевых видов насекомых (например, медоносных пчел [Sami, Bilal, Khalid et al., p. 726]) [Lang, Zhu, Zhang, p. 496; Casu, Tardelli, de Marchi et al., p. 884; Karmaz, Ozkan, Yetim et al., p. 2916] из-за острой токсичности и эффектов биоаккумуляции самих инсектицидов или их производных [Bilal, Hassan, Rehman et al., p. 3].

Химическая борьба против взрослой стадии *M. domestica* осуществляется в основном синтетическими инсектицидами во многих странах мира (в Китае [Qiu, Pan, Li et al., p. 202; Wang, Li, Pan et al., p. 154], Турции [Baskurt, Taskin, Dogac et al., p. 249], Иране [Ahmadi, Khajehali, p. 345]), такими как пиретроиды (циперметрин, дельтаметрин и перметрин [Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328]), неоникотиноиды, фосфорорганические соединения (ФОС) и карбаматы (КМ) [Ahmadi, Khajehali, p. 345; Qu, Zhu, Li et al., p. 2339; You, Shan, Ma et al., p. 4322; Sinha, Kumar, Ungarala et al., p. 4; Braga, Silva, Mancini et al., p. 4].

Применение даже относительно новых и менее распространённых инсектицидов, таких как фипронил и хлорфенапир, вызывает появление устойчивых к ним популяций насекомых-вредителей.

Фипронил относится к классу фенилпиразолов, обладает широким контактно-кишечным, системным спектром действия [Farder-Gomes, Fernandes, Bernardes et al., p. 2].

Фипронил – \pm - 5 - амино - 1 - (α , α , α – трифтор - 2, 6 - дихлор - n - талил) - 4 - трифторметилсульфинилпиразол - 3 - карбонитрил (Рисунок 1).

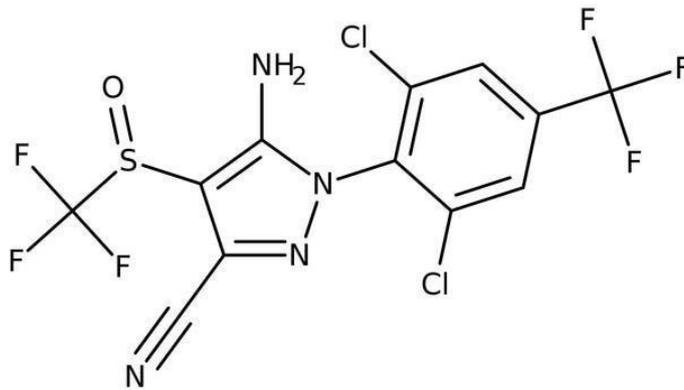


Рис. 1. Структурная формула фипронила

Фипронил действует как неконкурентный антагонист рецептора гамма-аминомасляной кислоты, который опосредует синаптическое торможение в центральной нервной системе насекомых и блокирует активируемые глутаматом хлоридные каналы [González-Morales, deVries, Sierras et al., p. 799], что приводит к перевозбуждению, судорогам, параличу и гибели насекомых [Singh, Sharma, Singh et al., p. 4; Farder-Gomes, Fernandes, Bernardes et al., p. 2].

Эффективен против жуков, трипсов, саранчовых, проволочников, минеров, пилильщиков [Mosha, Lyimo, Oxboroung, p. 645], бурильщиков рисовых стеблей, алмазной моли, листовертки, мучнистого червя, тли, саранчи, клещей, блох, термитов, муравьёв, тараканов., комаров и т. д. [Singh, Sharma, Singh et al., p. 4].

Особенность механизма действия делает его высокоэффективным против многих насекомых-вредителей, которые развили устойчивость к другим распространенным классическим инсектицидам, таким как пиретроиды (блокаторы натриевых каналов), фосфорорганические соединения и карбаматы (ингибиторы холинэстеразы) [Singh, Sharma, Singh et al., p. 4; Соболев, с. 357].

Резистентность к фипронилу была обнаружена у немецкого таракана *Blattella germanica* L. [González-Morales, deVries, Sierras et al., p. 799]. Проявляет перекрестную устойчивость к дильдрину (хлорорганическое соединение) у *Anopheles stephensi* [Mosha, Lyimo, Oxboroung, p. 646] и у *B. germanica* L. [González-Morales, deVries, Sierras et al., p. 799].

Фипронил обладает высокой стойкостью в почве (период полураспада 8,78-33 дня), низкой растворимостью в воде ($1,9 \text{ мг л}^{-1}$ при pH 5, 20°C) и высоким сродством к органическим веществам [Pinto, Moreira, Silva et al., p. 4]. В окружающей среде фипронил может подвергаться восстановлению, окислению, гидролизу или фотолизу с образованием фипронилсульфида, фипронилсульфона, фипронил амида или фипронил десульфинила [Singh, Sharma, Singh et al., p. 4].

Основным путем деградации фипронила организмами является окисление фипронила до фипронилсульфона ферментом цитохром P450 [Singh, Sharma, Singh et al., p. 4], эстеразы также играют важную роль в его детоксикации [González-Morales, deVries, Sierras et al., p. 799].

Согласно гигиенической классификации пестицидов по степени опасности, в связи с острой оральной, дермальной и ингаляционной токсичностью фипронил относится к II классу опасности (высокоопасные вещества), по репродуктивной токсичности и канцерогенности – III классу опасности, тератогенности, эмбриотоксичности, мутагенности – IV классу. ЛД₅₀ для крыс 97 мг/кг [Соболев, с. 357].

Некоторые инсектициды, такие как хлорфенапир должны подвергаться биоактивации, опосредованной цитохромом P450, для создания их соответствующих метаболитов (CL 303268), которые являются токсичными [Coban, Carr, Chambers et al., p. 40].

Хлорфенапир (4 - бром - 2 - (4-хлорфенил) -1 - (этоксиметил) - 5 - (трифторметил) - 1 - Н - пиррол - 3 - карбонитрил) (Рисунок 2) – это пирроловый проинсектицид [Oxboroug, N'Guessan, Jones, p. 2]. Согласно схеме международного комитета по резистентности IRAC, хлорфенапир отнесен к классу 13 «Разобщители окислительного фосфорилирования посредством разрыва протонного градиента» [Ерёмина, с. 42].

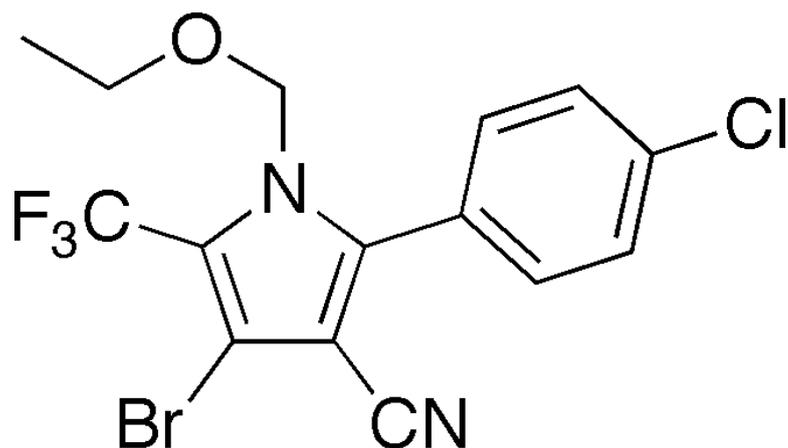


Рис. 2. Структурная формула хлорфенапира

Хлорфенапир по острой оральной токсичности ($СД_{50}$ для крыс 626 мг/кг) относится ко II классу опасности, по острой дермальной ($СД_{50}$ для кроликов >2000 мг/кг) и ингаляционной ($СК_{50}$ для крыс 1,9 мг/л) токсичности – к III классу опасности [Левченко, Балабанова, Бакинйева, с. 264]. Инсектицид не влияет на развитие плода, не обладает мутагенным эффектом [Ямов, Домацкий, Силиванова, с. 47].

Обладает преимущественно кишечной и некоторой контактной активностью, является проинсектицидом, нематоцидом и акарицидом широкого спектра действия [Ерёмина, с. 42].

Хлорфенапир – не репеллентный проинсектицид, эффективен против тараканов, постельных клопов, муравьёв, кровососущих мух, комаров, термитов и клещей, включая популяций, устойчивых к КМ, ФОС, пиретроидам и ингибиторам биосинтеза хитина [Ерёмина, с. 44].

Окислительное удаление N-этоксиметильной группы хлорфенапира монооксигеназами цитохром Р450 приводит к образованию токсической формы молекулы, идентифицированной как CL 303268 (4 - бром - 2 - (p-хлорфенил) - 5 - (трифторметил) - 1Н - пиррол - 3 - карбонитрил), которое нарушает окислительное фосфорилирование в митохондриях, приводит к перебоям в синтезе АТФ, а соответственно к энергетическому голоданию клеток и в итоге к гибели организма [Kouassi, Constant, Tia et al., p. 2; Ямов, Домацкий, Силиванова, с. 47].

Токсичность хлорфенапира ночью увеличивается, т. к. некоторые цитохромы P450, участвующие в окислительном метаболизме, находятся под циркадианным контролем и сильнее экспрессируются в ночное время, [Mosh, Lyimo, Oxborough, p. 647]. Токсическое действие хлорфенапира изменяется в зависимости от температуры. При высоких температурах, предположительно, из-за повышения интенсивности метаболизма и клеточного дыхания смертность возрастает [Oxboroug, N'Guessan, Jones, p. 3].

Механизм формирования резистентности к хлорфенапиру достаточно видоспецифичен. Например, у природной популяции паутиного клеща (*Tetranychus urticae* Koch.) устойчивость вырабатывается посредством увеличения активности монооксигеназ и эстераз, у скошеннополосой листовёртки (*Choristoneura rosaceana* Har.) – глутатион S-трансфераз (GST); у клопа обыкновенного (*Oxycarenus hyalinipennis* Costa) – эстераз; у *M. domestica* – монооксигеназ цитохром P450 (у самок и самцов), неспецифических эстераз (у самок) и щелочной фосфатазы (у самок) [Силиванова, Шумилова, Левченко, с. 493].

Перекрестной резистентности к существующим классам инсектицидов хлорфенапир не проявляет [Corine, Ngufor, Critchley, p. 2; Kouassi, Constant, Tia et al., p. 2]. Например, отрицательная перекрестная резистентность (повышенная восприимчивость) к хлорфенапиру, наблюдается у штаммов с P450-опосредованной резистентностью к инсектицидам – роговой мухи (*Haematobia irritans*) и табачной листовёртки (*Heliothis virescens*), но этот эффект не проявляется у малярийных комаров (*Anopheles stephensi*), характеризующихся повышенной активностью P450 [Oliver, Kaiser, Wood, p. 128].

2. ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСЕКТИЦИДАМ

В целом, известно, что в устойчивости к инсектицидам участвуют четыре типа механизмов [Ahmed, Wilkins, p. 511; Chang, Cheng, Huang et al., p. 1931; Hrabcova, Korabecny, Manyova et al., p. 39280; Farooq, Freed, p. 28; Riaz, Zahoor, Malik et al., p. 2; и др.]:

- уменьшение поглощения токсических агентов путем внесения изменений в экзоскелете;
- изменение поведенческих реакций (изменение пищевого поведения, яйцекладки);
- повышение детоксикации инсектицидов с помощью ферментов (эстераз и ДДТ-дегидрохлориназы, оксидаз смешанной функции, или глутатион-s-трансфераз);
- изменения в целевом сайте объекта-мишени инсектицида (изменение чувствительности к инсектицидам).

2.1. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

Устойчивость определяется как унаследованный потенциал популяции переносить дозу инсектицида, которая является смертельной для большинства особей восприимчивой популяции того же вида. В настоящее время в популяциях более 600 видов насекомых и клещей установлена резистентность как минимум к одному инсектициду и известно о 339 инсектицидах, устойчивость к которым зафиксирована у одного и более видов [Sparks, Crossthwaite, Nauen et al., p. 3].

Например, разные уровни устойчивости к ФОС-инсектицидам, диазинону (в 6,8-72 раза) и фенитропиону (в 7-27 раз), были зарегистрированы в полевых популяциях комнатной мухи в Эр-Рияде, Саудовской Аравии [Abobakr, Al-

Hussein, Bayoumi et al., p. 4]; в России выявлены популяции комнатной мухи с высокими показателями резистентности: в Москве к некоторым пиретроидам (тетраметрину, d-фенотрину, перметрину и циперметрину), дихлорфосу; в животноводческих хозяйствах Тюменской области к неоникотиноиду ацетамиприду [Давлианидзе, Еремина, с. 73].

Повышенная активность детоксицирующего фермента (ферментов) обычно проявляется у особей резистентного штамма по сравнению с чувствительным штаммом. Повышенная активность может наблюдаться как у одного основного фермента (цитохрома P450 для ДДТ и пиретроидов) или более одного фермента (цитохрома P450, эстераз, GSTs) [Ahmed, Wilkins, p. 511].

Интенсивное применение антихолинэстеразных инсектицидов (хлорорганических соединений, ФОС, КМ) привело к развитию устойчивости к ним у популяций насекомых [Lang, Zhu, Zhang, p. 496] из-за изменения активности ацетилхолинэстеразы (AChE, АХЭ) [Mohamed, Shaalan, Ghazy et al., p. 1030] с образованием менее токсичных метаболитов [Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328]. Изменение активности АХЭ может быть связано либо с присутствием большего количества ферментного белка в устойчивом штамме (амплификации гена), либо с повышением каталитической эффективности фермента (мутация гена) [Mohamed, Mahdy, Ghazy et al., p. 12].

Активное применение ФОС началось примерно в начале 1960-х годов для борьбы с овечьей мухой (*L. cuprina*) и комнатной мухой (*M. domestica*), а первые устойчивые к ним насекомые были определены уже в середине 1960-х годов [Taskin, Kence, p. 1215]. Существуют виды, такие как *Nephotettix cincticeps*, *Boophilus microplus* и *L. cuprina*, у которых устойчивость к ФОС объясняется повышенным уровнем детоксицирующих эстераз (неспецифических эстераз) или глутатионтрансфераз (GSTs), которые могут связывать и изолировать эти инсектициды, не позволяя им достичь своей цели – AChE [Kakani, Sagri, Omirou et al., p. 744].

У резистентных к инсектицидам насекомых, как правило, регистрируют увеличение активности CarE. Так, в работе Zhang с соавторами было выявлено значительное повышение карбоксилэстеразной активности у линии *M. domestica* резистентной к пиретроиду бета-циперметрину [Zhang, Gao, Liang, p. 66]. У самок *M. domestica* со сформированной резистентностью к неоникотиноиду тиаметоксаму активность карбоксилэстеразы была в 1,5 раза выше, чем у контрольных особей [Khan, Akram, Iqbal et al., p. 5]. Однако, формирование инсектицидной резистентности у *M. domestica* не всегда сопровождается активацией эстеразных систем. Например, в работе Zhang с соавторами отмечено снижение карбоксилэстеразной активности самок и самцов спиносад-резистентной линии комнатной мухи [Zhang, Guo, Ma et al., p. 36].

2.1.1. ЭСТЕРАЗЫ

Эстеразы представляют собой подкласс гидролаз, катализирующих гидролитическое расщепление различных сложных эфиров органических соединений [Serebrov, Bakhvalov, Glupov, p. 10], т. е. присоединение молекулы воды к сложному эфиру с образованием кислоты и спирта. Поэтому они играют важную роль в биотрансформации ксенобиотиков в большинстве организмов [Cao, Herrero-Nogareda, Cedergreen, p. 4].

К важным функциям эстераз в организме насекомых относятся катаболизм эфиров высших жирных кислот, активно происходящий в летательных мышцах и обеспечивающий полет насекомого, мобилизация липидов, в том числе жиров в жировом теле, и деградация метаболических инертных эфиров, в том числе и разнообразных ксенобиотиков [Дубовский, Слямова, Крюков и др., с. 1361].

Для эстераз также характерно наличие разных изоформ, определяющих их широкую субстратную специфичность при деградации токсинов различного происхождения [Дубовский, Слямова, Крюков и др., с. 1361; Соколянская М. П.,

автореферат; Соколянская, Амирханов, с. 8], например, инсектицидов [Дубовский, Слямова, Крюков и др., с. 1361; Смирнов, с. 123; Соколянская, Амирханов, с. 57] или токсинов, образующихся при развитии инфекций насекомых [Дубовский, Слямова, Крюков и др., с. 1361].

Повышение активности эстераз является одним из основных механизмов устойчивости насекомых к инсектицидам и положительно коррелирует с переносимостью инсектицидов у многих видов насекомых [Соколянская, Амирханов, с. 57; Milone, Rinkevich, McAfee et al., p. 5; Serebrov, Bakhvalov, Glurov, p. 10].

2.1.1.1. КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗА

Среди неспецифических эстераз членистоногих большое внимание привлекает карбоксилэстераза (КФ 3.1.1.1; КЭ, CarE), которая осуществляет гидролиз карбоксилэфирных связей и участвует как в процессах детоксикации экзогенных соединений, так и в метаболизме соединений, имеющих физиологическое значение [Соколянская М. П., автореферат; Althalji, Gorgun, p. 368; Milone, Rinkevich, McAfee et al., p. 5]. Под действием карбоксилэстераз инсектициды превращаются в менее токсичные соединения, которые затем выводятся из организма насекомых. Показано участие CarE в метаболизме ФОС, КМ [Grigoraki, Balabanidou, Meristoudis et al., p. 62], пиретроидов и развитии резистентности к ним [Feng X., Liu, p. 9; Fonseca-Gonzalez, Quinones, McAllister et al., p. 19; Grigoraki, Balabanidou, Meristoudis et al., p. 62; Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328; Li, Liu, Lu et al., p. 9].

Сверхэкспрессия карбоксилэстераз была обнаружена у многих устойчивых видов насекомых, включая *Aphis gossypii*, *Culex quinquefasciatus*, *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae*, *Musca domestica*, *Boophilus microplus*, *Aedes aegypti* и *Helicoverpa armigera*, указывая на то, что КЭ-опосредованный

метаболизм придает устойчивость к инсектицидам. Кроме того, индукция карбоксилэстераз инсектицидами имеет большое значение для усиления метаболической детоксикации инсектицидов у таких видов насекомых, как *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Tetranychus cinnabarinus* и *Leptinotarsa decemlineate* [Feng, Li, Liu, p. 31].

У комаров *Aedes aegypti* и *Anopheles gambiae*, карбоксилэстеразы метаболизируют пиретроиды с образованием феноксибензойного спирта и феноксибензальдегида, которые в дальнейшем под действием цитохромов P450 могут превращаться в феноксибензойную кислоту. В *in vitro* экспериментах была показана способность разных изоформ карбоксилэстеразы *Musca domestica* осуществлять гидролиз перметрина, но не его метаболитов [Feng X., Liu, p. 9]. Возможность *in vitro* метаболизма β -циперметрина и фенвалерата под действием карбоксилэстеразы хлопковой совки *Helicoverpa armigera* была продемонстрирована в работе Li с соавторами [Li, Liu, Lu et al., p. 9].

2.1.1.2. АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА

Ацетилхолин (ACh) – нейромедиатор, присутствующий в центральной, периферической нервных системах и в нервно-мышечных соединениях [da Silva, Nogara, Ochoa-Rodriguez et al., p. 298], является нейротрансмиттером в синапсах холинергических нервов. К ним относятся постганглионарные парасимпатические и холинергические симпатические нервы, а также как симпатические, так и парасимпатические преганглионарные волокна [Arora, Valotra, Pandey et al., p. 9]. ACh синтезируется специфическим ферментом (холинацетилтрансферазой) из холина и кофермента А, переносится в везикулы и затем высвобождается в синаптическую щель, воздействуя на мускариновые и/или никотиновые рецепторы ACh [da Silva, Nogara, Ochoa-Rodriguez et al., p. 298].

Физиологически прерывание холинергической нейротрансмиссии осуществляется холинэстеразами [da Silva, Nogara, Ochoa-Rodriguez et al., p. 298], названными так за способность эффективно гидролизовать сложные эфиры холина [Stojan, pt. B, p. 111].

В отличие от позвоночных у насекомых только одна [Kim, Choi, Je et al., p. 766; Kim, Cha, Jung et al., p. 2; Ho, Kwon, Hyeock et al., p. 466] быстродействующая высокоспецифичная холинэстераза – ацетилхолинэстераза [Stojan, pt. B, p. 111].

Ацетилхолинэстераза (EC 3.1.1.7; АХЭ, АСhE) – это сериновая эстераза [Li, Gao, Lan et al., p. 2; Bi, Ouyang, Wei et al., p. 2] из семейства α -, β -гидролаз [Walsh, Dolden, Moores et al., pt. 1, p. 176; Swale, Carlier, Hartsel et al., p. 1159; Marinho, Matias, Brandao et al., p. 12; Meek, Reiss, Crow et al., p. 405]. Она обнаруживается в нескольких типах тканей, включая проводящие, периферические, холинергические и нехолинергические ткани [Ujan, Saeed, Channar et al., p. 2]. Этот фермент обладает высоким сродством к эфирам холина, но также способен гидролизовать другие эфиры (ФОС [Arora, Kumar, p. 94]), но при более низкой скорости гидролиза [Freitas, Santos, Sarcinelli et al., p. 2].

АХЭ является ключевым ферментом холинергической нейротрансмиссии, поскольку она регулирует уровень ацетилхолина [Mukhametgalieva, Aglyamova, Lushchekina et al., p. 2; Bilal, Hassan, Rehman et al., p. 3; Hsiao, Lai, Liao et al., p. 5341], катализируя его гидролиз [Shi, Yuan, Wu et al., p. 73; Araujo, Assis, Silva et al., p. 214; Ujan, Saeed, Channar et al., p. 2; Karmaz, Ozkan, Yetim et al., p. 2916] на холин и уксусную кислоту [Xiao, Dou, Li et al., p. 159; Foil, Guerrero, Bendele, p. 856; Matos, da Cunha, Goncalves et al., p. 547; Klichkhanov, Dzhafarova, Al-Rabeei, p. 202; Meek, Reiss, Crow et al., p. 405; и др.].

У беспозвоночных АСhE могут кодировать один или несколько генов [Kim, Cha, Jung et al., p. 2; Ho, Kwon, Hyeock et al., p. 466]. У насекомых АСhE кодируется геном Ace [Lang, Shang, Chen et al., p. 1796; Baskurt, Taskin, Dogac et al., p. 249; Kakani, Trakala, Drosopoulou et al., p. 37] локусы ace-1 и ace-2 [Sami,

Bilal, Khalid et al., p. 726; You, Shan, Xin et al., p. 2]). Например, хлопковая тля (*Aphis gossypii*) и комар *Culex pipiens* имеют два гена [Badiou, Brunet, Belzunces, p. 123], у зеленого клопа (*Schizaphis graminum*), алмазной моли (*Plutella xylostella*), немецкого таракана (*Blattella germanica*), медоносной пчелы (*Apis mellifera*) также несколько локусов гена AChE [Badiou, Brunet, Belzunces, p. 123; Но, Kwon, Hyeock et al., p. 466], но несколько циклорафановых мух (*Cyclorrhapha*), таких как *Drosophila melanogaster* [Chen, Han, Qiao et al., p. 173; Kim, Lee, Choi et al., p. 880] и *Musca domestica* имеют только один локус гена AChE [Kim, Choi, Je et al., p. 766; Но, Kwon, Hyeock et al., p. 466; Kim, Lee, p. 48].

Первый тип гена AChE, который ортологичен *ace* *Drosophila* (*ace2*), является общим для всех видов насекомых, тогда как второй тип гена AChE паралогичен *ace* (*ace1*) и не идентифицирован у двукрылых *Cyclorrhapha* [Kim, Choi, Je et al., p. 766]. Из двух генов *ace* насекомых ген *ace1*-типа экспрессируется намного выше, чем ген *ace2*-типа [Sami, Bilal, Khalid et al., p.

726] (*P. xylostella*, *Helicoverpa assulta*, *B. germanica*, *Pediculus* spp. и *Cimex lectularius* [Kim, Choi, Je et al., p. 766]), уровень транскрипции AChE1 примерно в 2-250 раз выше, чем у AChE2 [Kim, Choi, Je et al., p. 766; Kim, Lee, p. 48]. Оба гена *ace* были получены в результате события дублирования, которое произошло задолго до дифференциации насекомых [Но, Kwon, Hyeock et al., p. 466; Kim, Lee, p. 48].

В дополнение к различным локусам *ace*, выражающим функциональное различие АХЭ, существуют множественные молекулярные конформации каждой [Kakani, Trakala, Drosopoulou et al., p. 37], способствуя их функциональной диверсификации [Badiou, Brunet, Belzunces, p. 123; Kim, Cha, Jung et al., p. 2]. Разнообразие молекулярных форм АХЭ говорит о наличии дополнительных, «неклассических» функций у этого фермента [Klichkhanov, Dzhafarova, Al-Rabeei, p. 202], включая рост нейритов, формирование синапсов, модуляцию глиальной активации [Kim, Lee, p. 48]. Таким образом, AChE играет

центральную роль в функционировании всей нервной системы [Marimuthu, Lee, Kim et al., p. 308].

Активный центр фермента расположен на дне глубокого и узкого ущелья [Hrabcova, Korabecny, Manyova et al., p. 39280]. Он состоит из каталитической триады Ser-His-Glu и периферийного анионного участка [Xie, Mei, Ning, p. 346] (Рисунок 3). Активный центр включает Ser203, который и катализирует реакцию гидролиза ACh посредством нуклеофильной атаки на карбонил С ACh [Lee, Kim, Lee, p. 716].

Глубокое и узкое ущелье содержит четырнадцать ароматических остатков, которые занимают около 40% поверхности ущелья [Xie, Mei, Ning, p. 346], его длина составляет около 20 Å [Lee, Kim, Lee, p. 716; Stojan, pt. B, p. 111; Sami, Bilal, Khalid et al., p. 726] с двумя отдельными участками связывания лиганда [Rosenberry, p. 33]. Ущелье находится примерно в 18 Å от периферийного анионного участка и активного центра кармана [Xie, Mei, Ning, p. 346].

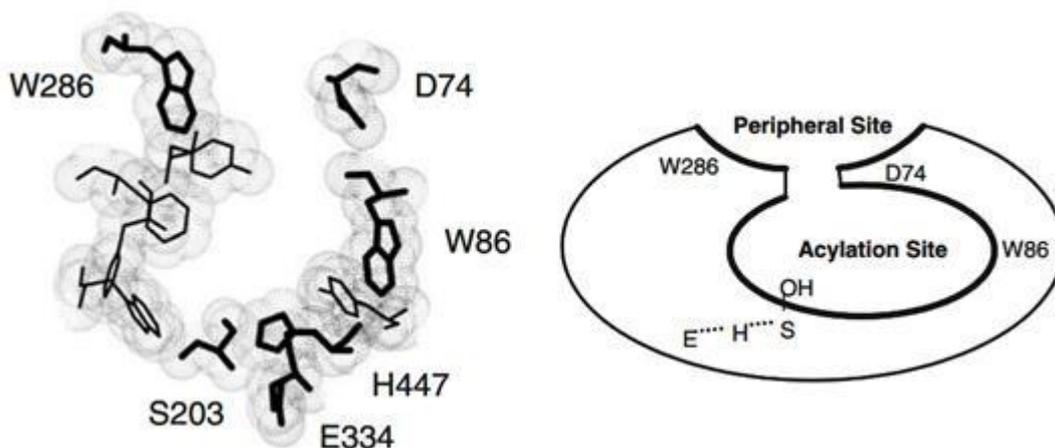


Рис. 3. Структура активного центра АХЭ

Примечание: на правой части схематическое изображение двух областей для ассоциации лигандов внутри активного сайта AChE, сайта ацилирования (А-сайт) и периферийного сайта (Р-сайт) [Rosenberry, p. 33]

В основании ущелья находится сайт ацилирования или А-сайт, где остаток W861 связывает триметиламмониевую группу ацетилхолина, а H447, E334 и

S203 участвуют в триаде, которая катализирует переходное ацилирование и деацилирование S203 во время каждого оборота субстрата [Rosenberry, p. 33].

Многие молекулярные формы АХЭ закреплены на мембране, обеспечивая иммобилизацию там, где необходима ферментативная активность, например, в синапсах и моторной концевой пластинке [Freitas, Santos, Sarcinelli et al., p. 2]. Различные формы соответствуют различным четвертичным структурам и демонстрируют различные способы закрепления [Badiou, Brunet, Belzunces, p. 123].

АХЭ насекомых представляет собой глобулярный амфифильный димер (G2m), состоящий из двух мономеров, прикрепленных к мембране с помощью гликолфосфатидилинозитолового якоря (GPI) [Kim, Cha, Jung et al., p. 2]. Такой способ прикрепления амфифильных форм обнаружен у многих видов беспозвоночных (дрозофила (*D. melanogaster*), паразит *Platyhelminth*, медоносная пчела (*A. mellifera*) [Badiou, Brunet, Belzunces, p. 123; Но, Kwon, Hyeock et al., p. 466]. Этот якорь GPI ковалентно прикреплен к гидрофобному домену С-конца АСhЕ [Kakani, Trakala, Drosopoulou et al., p. 37]. Процесс добавления GPI, глипирование, включает расщепление С-концевого пептида и ковалентное присоединение единственной молекулы фосфатидилинозитола на С-конце каждого полипептида каталитической субъединицы [Badiou, Brunet, Belzunces, p. 123].

Гидрофильный водорастворимый димер (G2s) может быть получен из амфифильного димера путем протеолиза [Kim, Choi, Je et al., p. 766; Kim, Cha, Jung et al., p. 2].

Третья форма представляет собой мономер (G1), который, как полагают, образуется в результате восстановления двух димеров. Кроме того, у *D. melanogaster* компоненты 55 и 18 кДа образуются в результате протеолитического расщепления предшественника АСhЕ 75 кДа [Kim, Choi, Je et al., p. 766; Kim, Cha, Jung et al., p. 2], тот же механизм расщепления характерен и для *M. Domestica* [Fournier, Cuany, Bride et al., p. 1456].

Эти формы белка выделены в разных пропорциях у разных видов. У насекомых, в том числе и у *M. domestica*, обычно преобладает амфифильная форма [Fournier, Cuany, Bride et al., p. 1456].

2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Обычно количественные и качественные изменения АСhЕ, связанные с устойчивостью к инсектицидам [You, Shan, Xin et al., p. 2], объясняются точечными мутациями в гене *Ace*, кодирующего фермент, который становится менее чувствителен к ингибированию антихолинэстеразными инсектицидами [Lang, Zhu, Zhang, p. 496], это является основным механизмом устойчивости к ФОС и КМ у насекомых [Walsh, Dolden, Moores et al., pt. 1, p. 176; Temeyer, Chen, p. 86; Baskurt, Taskin, Dogac et al., p. 249; Ahmadi, Khajehali, p. 345].

У насекомых, не относящихся к *Cyclorrapha* более высокая экспрессия *ace1*, поэтому с большей вероятностью она связана с устойчивостью к ФОС, КМ и мутации, происходящие в гене *ace1*, придают нечувствительность АСhЕ к этим двум классам инсектицидов [Kim, Choi, Je et al., p. 766; Kim, Lee, p. 48; Chang, Cheng, Huang et al., p. 1931]. Напротив, мутации, связанные с нечувствительной АСhЕ, не обнаруживаются в локусе *ace2* у нескольких насекомых. Это свидетельствует о том, что АСhЕ1 может быть основным АСhЕ, участвующим в синаптической передаче в холинергических синапсах насекомых, обладающих как АСhЕ1, так и АСhЕ2 [Ho, Kwon, Hyeock et al., p. 466; Kim, Lee, p. 48].

Пониженная чувствительность АСhЕ из-за точечных мутаций в активном участке или вокруг него [Kakani, Sagri, Omirou et al., p. 744] является важным механизмом детоксикации у многих видов насекомых [Farooq M., Freed S., 2018; Ahmadi, Khajehali, p. 345], включая обыкновенного паутиного клеща (*Tetranychus urticae* Koch.), австралийскую овечью муху (*L. cuprina* Wiedemann), комнатную муху (*M. domestica*) [Kozaki, Shono, Tomita et al., p. 130; Ranian,

Zahoor, Zahoor et al., p. 328], дрозофилу (*D. melanogaster*) [Kakani, Sagri, Omirou et al., p. 744], колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*), оливковую плодовую муху (*Bactrocera oleae*) и хлопковую тлю (*Aphis gossypii*) [Kakani, Trakala, Drosopoulou et al., p. 37], домашнего комара (*C. pipiens*), немецкого таракана (*B. germanica*) [Kim, Cha, Jung et al., p. 2].

Нечувствительность АСhЕ у *M. domestica* – основной фактор устойчивости к ФОС в Японии на свалке (Юменосима) в Токийском заливе, где мухи развили высокий уровень устойчивости к дихлофосу и фенитроотиону в период с 1978-1986 гг [Kozaki, Shono, Tomita et al., p. 130]; на Тайване у полевых популяций восточной плодовой мухой (*Bactrocera dorsalis* Hendel) развилась устойчивость к ФОС и КМ по причине изменения АСhЕ [Hsiao, Lai, Liao et al., p. 5341]. И наоборот, фосфорорганический инсектицид азаметифос был введен в Данию для борьбы с *M. domestica* в 1983 году. Несмотря на то, что он попал в среду, где устойчивость к ФОС была широко распространена, но азаметифос показал отсутствие перекрестной резистентности, что объясняется большей чувствительностью АХЭ к этому инсектициду [Kristensen, Knorr, Spencer et al., p. 1789].

Мутации, связанные с устойчивостью к ФОС и КМ, описаны в целевом участке АСhЕ у *M. domestica*, выявлено шесть мутаций – V260L, A316S, G342A, G342V, F407Y и G445A [Qiu, Pan, Li et al., p. 202; Wang, Li, Pan et al., p. 154; You, Shan, Xin et al., p. 2; Qu, Zhu, Li et al., p. 2339] по отдельности или в комбинации в гене Ace [Baskurt, Taskin, Dogac et al., p. 249], которые модифицируют аминокислотные остатки в области активного центра фермента, близкой к каталитической триаде [Walsh, Dolden, Moores et al., pt. 1, p. 176].

Колорадский картофельный жук (*Leptinotarsa decemlineata*) является единственным насекомым-фитофагом, у которого была выявлена мутация АСhЕ (серин в глицин), связанная с нечувствительностью, данная мутация удалена от каталитической области фермента [Walsh, Dolden, Moores et al., pt. 1, p. 176].

Многие виды комаров имеют два различных гена *ace*, и мутация (G119S гена *ace-1*) в оксианионном отверстии фермента придает высокую устойчивость к ФОС и КМ (*C. pipiens*, *An. gambiae* и *An. albimanus*) [You, Shan, Xin et al., p. 2].

Модификации *ace-2*, связанные с устойчивостью, были описаны у *D. melanogaster*, *Lucilia* и *Bactrocera oleae* [You, Shan, Xin et al., p. 2]. Например, у оливковой плодовой мухи (*B. oleae*) две несинонимичные точечные мутации (G488S, I241V) и одна короткая делеция (три глутамина) в гене *ace* влияют на чувствительность к инсектицидам, в то время как метаболическая резистентность не играет важной роли [Kakani, Sagri, Omirou et al., p. 744].

У нескольких видов членистоногих сообщалось о перепроизводстве *ace* (дупликация генов, повышающая регуляция) в качестве эволюционного ответа на давление инсектицидного отбора. У *D. melanogaster* было подтверждено, что повышенное количество AChE коррелирует с устойчивостью к паратиону в некоторых полевых популяциях [You, Shan, Xin et al., p. 2].

Такие изменения AChE ограничивают применение антихолинэстеразных инсектицидов, поскольку эти инсектициды не могут обеспечить адекватный контроль устойчивых популяций видов вредителей [Lang, Zhu, Zhang, p. 496].

Существует два основных механизма развития метаболической резистентности, опосредованной карбоксилэстеразами. Во-первых, мутационные изменения в кодирующих фермент генах могут приводить к изменению таких его характеристик как субстратная специфичность, сродство к субстрату, кинетические параметры. Второй механизм формирования метаболической резистентности связан с повышенной экспрессией неизмененных карбоксилэстераз, что позволяет эффективно секвестрировать (локализовать и удерживать) инсектициды вместо гидролиза [Li, Liu, Lu et al., p. 9].

Устойчивость к некоторым ФОС и КМ у некоторых штаммов *M. domestica* связан со снижением карбоксиэстеразной активности [Wang, Li, Pan et al., p. 154]. У штаммов *L. cuprina* и *M. domestica* устойчивость к диазинону и

малатиону в основном обусловлена геном карбоксилэстеразы. Этот основной ген устойчивости к ФОС (у *L. cuprina*, названный LCAE7, у *M. domestica*, названный MDAE7) кодирует основные алиэстеразы, которые также известны как изоферменты эстеразы, ALI и E3, соответственно. Гены MDAE7, LCAE7 расположены в кластере близкородственных генов эстеразы, называемом кластером α -эстеразы [Taskin, Kence, p. 1215; Wang, Li, Pan et al., p. 154].

Известно о мутациях Gly137Asp и Trp251Leu/Ser в генах CarE, приводящих к изменениям в структуре активного центра фермента, следствием чего является повышение гидролитической активности по отношению к ФОС и снижение активности по отношению к другим субстратам, таким как 1-нафтилацетат [Li, Farnsworth, Coppin et al., p. 4]. Такие мутации были описаны у резистентных к ФОС насекомых отряда двукрылые (*Diptera*) из семейств мясные мухи (*Calliphoridae*) – *L. cuprina*, *L. sericata*, *Cochliomyia hominivorax*; настоящие мухи (*Muscidae*) – *M. domestica*; кровососущие комары (*Culicidae*) – *C. pipiens* [Gong, Ai, Li et al., p. 703; Gong, Yu, Shang et al., p. 2; Li, Farnsworth, Coppin et al., p. 4]. Сообщалось также о мутации Trp251Gly у особей малатион-резистентной линии паразитоидных ос *Anisopteromalus calandrae*. В работе Gong с соавторами показано, что у особей ометоат-резистентной линии хлопковой тли *Aphis gossypii* несинонимические замены в последовательности гена CarE, в частности His104Arg и особенно в комбинации с Ala128Val или Thr333Pro, увеличивали гидролитическую активность фермента по отношению к ФОС [Gong, Ai, Li et al., p. 703].

Из трёх несинонимичных замен в карбоксилэстеразе (W251L, W251S, W251C) две обнаружены (W251L и W251S) [Qu, Zhu, Li et al., p. 2339] обнаружены у *M. domestica* в Китае [Qiu, Pan, Li et al., p. 202], способствуя развитию устойчивости.

Реализация другого механизма – повышение экспрессии генов ферментов – может происходить либо за счет увеличения числа их копий, либо за счет регуляции, усиливающей их транскрипцию. Изменение числа копий генов

(дупликации и амплификации) и вклад данного механизма в формирование инсектицидной резистентности подробно описаны в обзоре Weetman с соавторами [Weetman, Djogbenou, Lucas, p. 83]. В литературе приводятся сведения о повышенной экспрессии генов ферментов детоксикации, ответственных за механизмы резистентности к различным ксенобиотикам, у насекомых из отрядов: полужесткокрылые (*Hemiptera*) – клопа (*Lygus lineolaris* Pal. de Beauv.) и персиковой тли (*Myzodes persicae* Sulz.), перепончатокрылые (*Hymenoptera*) – наездника габробракон (*Habrobracon hebetor* Say.), чешуекрылые (*Lepidoptera*) – стеблевая огневка (*Chilo suppressalis* Walker), двукрылые (*Diptera*) – малая коровья жигалка (*Haematobia irritans* L.) и комара обыкновенного (*C. pipiens* L.) [Дубовский И. М. и др., 2011]. Показано, что карбоксилэстеразы хлопковой совки (*H. armigera*) участвуют в устойчивости к фосфорорганическим и пиретроидным инсектицидам через усиленную секвестрацию благодаря повышенной экспрессии генов [Li, Farnsworth, Coppin et al., p. 4; Li, Liu, Lu et al., p. 9]. Резистентность к темефосу у комаров *Aedes albopictus* была связана с повышенным уровнем экспрессии генов карбоксилэстераз (ССЕае3а и ССЕаеба), обусловленном их амплификацией [Grigoraki, Lagnel, Kioulos et al., p. 4].

У тли (*M. persicae*) и москитов (*C. quinquefasciatus*, *C. pipiens*) устойчивость к ФОС достигается путем тандемной амплификации генов до 300 копий определенного гена карбоксилэстеразы (почти 3% от общего белка организма). Несмотря на то, что фермент обладает незначительной гидролитической активностью ФОС, сверхэкспрессия позволяет ему изолировать достаточное количество ФОС для выживания организма, что предотвращает ингибирование АСhЕ в месте-мишени [Taskin, Kence, p. 1215].

Обобщая приведенные выше сведения, можно сказать, что эстеразы насекомых вносят значительный вклад в развитие резистентности к инсектицидам (хлорорганическим, фосфорорганическим, карбаматам, пиретроидам и др.) благодаря широкой субстратной специфичности данных

ферментов и существованию двух основных механизмов (мутационные изменения свойств фермента и усиление его экспрессии). Вероятно, оба описанных механизма могут быть одновременно вовлечены в формирование инсектицидной резистентности. Например, в работе Poupardin с соавторами описаны и высокий уровень экспрессии, и полиморфизм аминокислотной последовательности карбоксилэстеразы у темэфос-резистентной линии комаров *An. aegypti* [Poupardin, Srisukontarat, Yunta et al., p. 2].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования выступали лабораторная чувствительная (Лаб) и хлорфенапир-резистентная (СИХ) линии *Musca domestica*. Хлорфенапир-резистентная линия *Musca domestica* была получена на базе лаборатории ветеринарных проблем в животноводстве Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра Тюменского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук (ВНИИВЭА – филиал ТюмНЦ СО РАН) при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00059.

[изъято 9 страниц]

2.9. МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА (ПО ЛОУРИ)

Содержание белка в гомогенатах определяли фотометрически по методу Лоури, используя для построения калибровочного графика растворы бычьего сывороточного альбумина [Lowry, Rosebrough, Farr, p. 266].

Реактивы, использованные для определения содержания белка по Лоури:

1. Na_2CO_3 2 % h-h в 0,1 н NaOH:

Na_2CO_3 – 5 г;

NaOH – 1 г (до 250 мл H_2O);

2. CuSO_4 0,5% p-p в 1% p-ре цитрата натрия (трехзамещенного):

CuSO_4 – 0,5 г;

цитрат Na – 1 г (до 100 мл H_2O);

3. NaCl 0,9% (физ. p-p):

450 мг (до 50 мл H_2O);

4. Реактив Фолина (фабричный);

5. Стандартный раствор альбумина (БСА – бычий сывороточный альбумин):

БСА – 0,5 мг/мл и 0,2 мг/мл.

Схема:

Реактив А – $\text{CuSO}_4 : \text{Na}_2\text{CO}_3$ (1:50);

Реактив В – реактив Фолина : H_2O (1:1).

Таблица 5

Схема добавления компонентов (две повторности)

Компонент	Холостая	Опыт 1	Опыт 2
NaCl 0,9%, мл	0,1	-	-
Исследуемый материал, мл	-	0,1	0,1
H_2O , мл	0,3	0,3	0,3
Реактив А, мл	2,0	2,0	2,0
Инкубация 10 мин при комнатной температуре			
Реактив В, мл	0,2	0,2	0,2
Встряхнуть, инкубировать 30 мин, колориметрировать при $\lambda=720-750$ нм против H_2O			

Приготовление стандартных растворов (Таблица 6). Разливают в пробирки.

Таблица 6

Стандартные растворы БСА

Пробирка	Холостая проба	1	2	3	4	5	6	7	8
Белок, мкг/проба	0	50	100	150	200	20	40	60	80
ext ₁	0,005	0,19	0,32	0,42	0,52	0,09	0,16	0,22	0,27
ext ₂	0,01	0,19	0,32	0,42	0,52	0,085	0,16	0,22	0,27
Среднее	0,0075	0,19	0,32	0,42	0,52	0,0875	0,16	0,22	0,27
Δext		0,1825	0,3125	0,4125	0,5125	0,08	0,1525	0,2125	0,2625

Строят график зависимости ΔE_{ext} от содержания белка в пробе (Рисунок 5).

Содержание белка в пробе определяют по калибровочному графику.

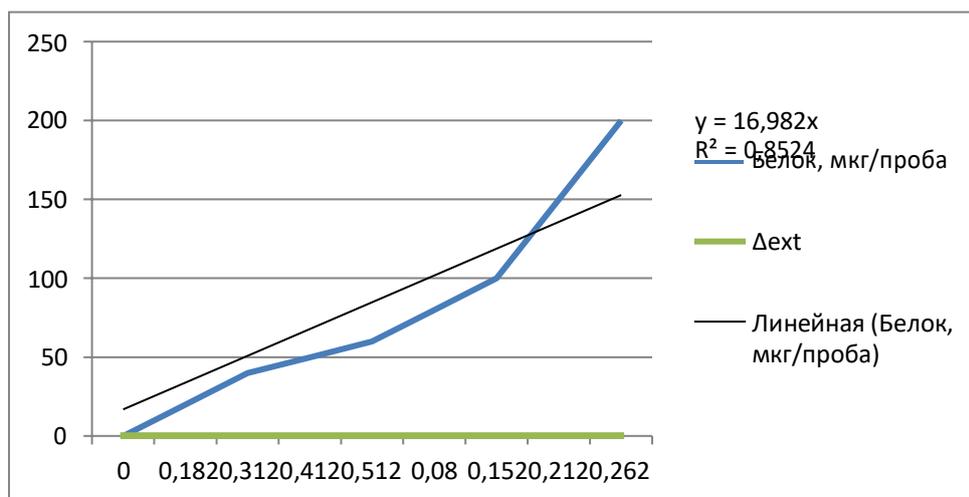


Рис. 5. График зависимости ΔE_{xt} от содержания белка в пробе

2.10. СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ

На начальной стадии анализа была использована описательная статистика для систематизации и количественного описания наблюдаемых величин. Были произведены расчеты основных статистических характеристик: среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартная ошибка средней.

Стандартное отклонение характеризует вариацию или рассеяние вариантов признака вокруг среднего арифметического значения [Зверев, Зефилов, с. 19].

Ошибка среднего характеризует точность выборочной оценки среднего значения показателя и зависит от вариабельности и репрезентативности выборки, т.е. она дает понять, насколько сильно отклонение от точного значения среднего в выборке [Тихова, с. 51].

Статистический анализ результатов определения активности фермента проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Тьюки для множественных сравнений с помощью пакета программ Statistica 13.3 (StatSoft, Россия). ANOVA предназначен для сравнения нескольких выборок (групп) и вычисления общего уровня значимости различий.

Результат ANOVA касается общего различия всех сравниваемых средних без конкретизации, какие именно выборки различаются. Для идентификации пар выборок, отличающихся друг от друга средними значениями, использовали апостериорные критерий парных сравнений – критерий Тьюки – критерий подлинной значимости. Различия были определены при уровне значимости – $p \leq 0,05$

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования проводились на базе Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиале ТюмНЦ СО РАН в период 2020-2022 гг.

В качестве объекта исследования выступали чувствительная лабораторная (Лаб) и хлорфенапир-резистентная (СИХ) линии *M. domestica* L.

В ходе исследования были изучены показатели смертности при воздействии сублетальных доз хлорфенапира и фипронила для имаго *M. domestica* лабораторной чувствительной (Лаб) (Приложение 1) и хлорфенапир-селектированной / резистентной (СИХ) культур (Приложение 2). Испытания инсектицидов проводили в следующих концентрациях (%): хлорфенапир – 0,015; 0,02; 0,025; 0,05, фипронил – 0,00025; 0,0005; 0,001; 0,002; 0,0025; 0,005 (Приложения 1-2), для каждой концентрации выполнено не менее 3 повторностей.

[изъята таблица и 4 абзаца]

На биохимическом уровне формирование инсектицидной резистентности у насекомых может сопровождаться изменением активности ферментов детоксикации.

Повышение активности карбоксилэстеразы является важным механизмом детоксикации ксенобиотиков-инсектицидов и участвует в развитии устойчивости насекомых к многим инсектицидам [Zhang, J. Shi, X. Shi et al., p. 7].

Например, в работе Н. А. А. Khan и W. Akram при анализе метаболических ферментов выявили значительно повышенную активность карбоксилэстеразы у циромазин-резистентном штамме *M. domestica* примерно на 60% по сравнению с лабораторным восприимчивым штаммом, что подтверждает участие КЭ в развитии резистентности к циромазину [Khan, Akram, p. 309].

В работе Z. Ma с соавторами было выявлено, что удельная активность карбоксилэстеразы выше у имидаклоприд-резистентного штамма *M. domestica*, чем у чувствительного. Гидролиз α -NA и β -NA у резистентного штамма в 1,28 и 1,45 раза выше, чем у чувствительного штамма. Также показано, что DEF (S.S.S-трибутилфосфоротритиоат – ингибитор эстеразной активности) оказывает значительное синергическое действие на токсичность имидаклоприда у резистентного штамма (синергический коэффициент у резистентного штамма в 1,8 раз выше) [Ma, Li, Zhang et al., p. 4].

В работе L. Zhang с соавторами отмечалась повышенная активность карбоксилэстеразы у бета-циперметрин-резистентного штамма *Musca domestica*, чем у чувствительного штамма [Zhang, Gao, Liang, p. 66].

В работе Н. А. А. Khan с соавторами было выявлено 50% повышение активности карбоксилэстеразы у тиаметоксам-резистентного штамма *M. domestica*. Также отмечен синергетический эффект при применении DEF (коэффициентами синергизма 2,94), что позволяет предположить, что карбоксилэстеразная детоксикация вовлечена в развитие резистентности к тиаметоксаму [Khan, Akram, Iqbal et al., p. 5].

Однако, формирование инсектицидной резистентности у *M. domestica* не всегда сопровождается повышением активности карбоксилэстеразы. Имеются сообщения о незначительном повышении или снижении карбоксилэстеразной активности резистентных линий *M. domestica*.

Например, в исследовании Н. А. А. Khan с соавторами была выявлено незначительное повышение активности карбоксилэстеразы у спиносад-резистентного штамма, всего на 1,3% [Khan, Akram, Ali, p. 621].

В исследовании Y. Zhang с соавторами показано, что для обоих полов *M. domestica* лабораторного и спиносад-резистентного штаммов характерно снижение неспецифической эстеразной активности при повышенных значениях ЛД50. Также использование синергиста DEF значительно увеличивала

токсичность спиносада как для самок, так и для самцов резистентного штамма [Zhang, Y. et al, 2019].

У *M. domestica* механизмы и скорость формирования резистентности могут несколько отличаться в зависимости от пола. В работе Е. А. Силивановой с соавторами было обнаружено повышение удельной активности КЭ у самок четвертого поколения селектированной хлорфенапиром линии в 1,4 раза, и ее снижение у самцов десятого поколения в 1,5 раза, в сравнении с показателями контрольной линии [Силиванова, Шумилова, Левченко, с. 493].

Результаты определения неспецифической и специфической эстеразной активности и у имаго *M. domestica* лабораторной чувствительной и хлорфенапир-резистентной культур приведены в приложениях 3-4.

[изъято 3 страницы]

Таким образом, при воздействии хлорфенапиром и фипронилом в пределах полулетальной дозы и выше не зафиксировано изменений неспецифической эстеразной активности как у самок, так и у самцов по сравнению с соответствующими контрольными особями.

АХЭ является объектом-мишенью для некоторых инсектицидов [Sharifi, Ghadamyari, Gholivand et al., p. 13] (фосфорорганические соединения, карбаматы, флавоноиды [Li, Gao, Lan et al., p. 2]). Изменение активности и чувствительности ацетилхолинэстеразы – важные механизмы детоксикации многих инсектицидов с образованием менее токсичных метаболитов [Ranian, Zahoor, Zahoor et al., p. 328].

Например, в исследовании Q. Li с соавторами активность ацетилхолинэстеразы у полевого штамма *M. domestica* (высокоустойчив к пропоксуру, циперметрину, имидаклоприду, низкоустойчив к индосакарбу, хлорпирифосу и фипронилу) была в 13,7 раза выше, чем у чувствительного штамма [Li, Huang, Yuan, p. 312].

В работе В. Riaz с соавторами на территории Пакистана были обнаружены повышенные уровни ацетилхолинэстеразы у популяций *M. domestica*

устойчивых к некоторым пиретроидам (тетраметрину, лямбда-цигалотрину, дельтаметрину, циперметрину) [Riaz, Zahoor, Malik et al., p. 8].

В работе Y. Abobakr с соавторами была обнаружена пониженная чувствительность ацетилхолинэстеразы к ингибированию диазиноном и фенитроотионом в полевых популяциях комнатных мухи по сравнению с чувствительным штаммом, что предполагает участие АХЭ в развитии резистентности в исследованных популяциях *M. domestica* [Abobakr, Al-Hussein, Bayoumi et al., p. 4].

[изъято 4 страницы]

Таким образом, воздействие фипронилом в пределах полулетальной дозы и выше сопровождалось изменением активности АХЭ у самок чувствительной линии, но не у самцов; при воздействии хлорфенапиром в полулетальной дозе изменений активности по сравнению с контролем не отмечено.

[изъято 5 страниц]

Таким образом, воздействие фипронилом в пределах полулетальной дозы и выше сопровождалось изменением кинетических параметров у самок, но не у самцов лабораторной линии; воздействие хлорфенапиром в полулетальной дозе не повлияло на параметры у имаго обоего пола резистентной линии.

Известные механизмы резистентности на основе эстеразы преимущественно включают повышение активности за счет амплификации генов и точечных мутаций в структурных генах эстераз, которые изменяют их субстратную специфичность [Zhang, Gao, Liang, p. 66]. Т.е. изменение уровня активности АХЭ [Mohamed, Shaalan, Ghazy et al., p. 1030] может быть связано либо с присутствием большего количества ферментного белка в устойчивом штамме (дупликация гена *ase*, повышающая регуляция), либо с более каталитически эффективным ферментом (точечные мутации гена *ase*) [Mohamed, Mahdy, Ghazy et al., p. 12].

Таким образом, в ходе работы было выявлено статистически значимые ($p \leq 0,05$) изменения остаточной активности и V_{max} у контрольной группы самок резистентной линии по сравнению с контрольной группой самок чувствительной линии, что говорит о возможных мутационных изменений в структуре АХЭ. При дальнейшем воздействии инсектицидов (хлорфенапир, фипронил) на самок резистентной линии статистически значимых по сравнению с контрольной группой самок той же линии изменений остаточной активности и кинетических параметров не происходит, что говорит о изменении активности за счет количественных изменениях АХЭ.

Статистически значимых изменений остаточной активности и кинетических параметров фермента у контрольной группы самцов хлорфенапир-резистентной линии (СИХ) по сравнению с контрольной группой самцов чувствительной линии не происходит, также не происходит статистически достоверных изменений остаточной активности и кинетических параметров при воздействии инсектицидов на самцов резистентной линии, что может говорить о отсутствии качественных изменений в структуре белка-мишени (АХЭ), а имеет место быть количественные изменения за счёт повышения экспрессии или амплификации гена *ase*.

Возможные качественных изменения в структуре АХЭ самок резистентной линии и природе количественных изменений активности АХЭ у самок и самцов резистентной линии требует дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Между контрольными группами имаго чувствительной и хлорфенапир-резистентной линий *M. domestica* не обнаружено статистически значимых отличий по неспецифической и специфической эстеразной активности;

2. При изучении кинетических параметров ацетилхолинэстеразы отмечено уменьшение V_{max} у самок хлорфенапир-резистентной линии на 36,90% по сравнению с данным показателем особей чувствительной линии, что может свидетельствовать о снижении каталитической активности фермента в отношении специфического субстрата (ацетилтиохолина) в процессе формирования устойчивости к хлорфенапиру;

3. При воздействии хлорфенапиром и фипронилом в полулетальных концентрациях и выше не зафиксировано статистически значимых изменений неспецифической эстеразной активности как у самок, так и у самцов чувствительной и хлорфенапир-резистентной линий *M. domestica* по сравнению с соответствующими контрольными особями;

4. Воздействие фипронилом в пределах полулетальной дозы и выше сопровождалось снижением удельной активности ацетилхолинэстеразы только у самок чувствительной линии на 33,20% относительно контрольных значений. При воздействии хлорфенапиром в полулетальной дозе изменений активности фермента у имаго чувствительной и хлорфенапир-резистентной линий *M. domestica* по сравнению с контролем не отмечено;

5. Воздействие фипронилом в полулетальной дозе и выше сопровождалось снижением V_{max} и K_m ацетилхолинэстеразы на 45,29% и 43,59% соответственно у самок, но не у самцов чувствительной линии *M. domestica* по сравнению с контрольными особями. Воздействие хлорфенапиром в полулетальной дозе и выше не повлияло на кинетические параметры ацетилхолинэстеразы имаго обоего пола чувствительной и хлорфенапир-резистентной линий *M. domestica*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансферазы у личинок перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Нуроcreales) / И. М. Дубовский, Н. Д. Слямова, В. Ю. Крюков [и др.] // Зоологический журнал. 2011. Т. 90. № 11. С. 1360-1364.
2. Давлианидзе Т. А., Еремина О. Ю. Санитарно-эпидемиологическое значение и резистентность к инсектицидам комнатных мух *Musca domestica* (аналитический обзор литературы 2000-2021 гг.) // Вестник защиты растений. 2021. Т. 104. № 2. С. 72-86.
3. Еремина О. Ю. Хлорфенапир – перспективный инсектицид из группы пирролов для борьбы с резистентными синантропными насекомыми // Пест-менеджмент. 2017. № 1 (101). С. 41-49.
4. Зверев А. А., Зефиоров Т. Л. Статистические методы в биологии: учебно-методическое пособие. Казань: КФУ. 2013. 42 с.
5. Кулакова А. М., Хренова М. Г., Немухин А. В. Молекулярный механизм реакции гидролиза хромогенного субстрата пара-нитрофенилацетата в активном центре карбоксилэстеразы-1 человека // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67. № 3. С. 300-305.
6. Методы определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов, используемых в медицинской дезинсекции. Методические указания. МУ 3.5.2.1759-03. Утв. гл. гос. сан. врачом РФ 28.09.2003.
7. Оборудование для борьбы с переносчиками. Прил. 4. / ВОЗ. – Женева, 1975. С. 175-176.
8. Острая токсичность инсектицидной приманки, содержащей хлорфенапир, для белых мышей / М. А. Левченко, Г. Ф. Балабанова, Р. Х.

Бикиняева [и др.] // Российский паразитологический журнал. 2017. Т. 41. № 3. С. 263-265.

9. Силиванова Е. А., Шумилова П. А., Левченко М. А. Активность ферментов детоксикации у имаго комнатной мухи *Musca domestica* L. При селекции хлорфенапиром // Биомика. 2020. Т. 12. № 4. С. 492-503.

10. Скрининг новых средств для уничтожения имаго и личинок мух *Musca domestica* / В. З. Ямов, В. Н. Домацкий, Е. А. Силиванова [и др.] // Пест-менеджмент. 2012. № 3 (83). С. 46-49.

11. Смирнов А. А. Изучение роли ферментативных систем в механизме устойчивости иксодовых клещей к некоторым препаратам // Ветеринарная патология. 2006. № 1 (16). С. 122-124.

12. Соболев Д. Н. Новые методические подходы к определению остаточных количеств инсектицида фипронила и его метаболита фипронил-сульфона в меде // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда». 2019. С. 356-358.

13. Соколянская М. П., Амирханов Д. В. Пути преодоления резистентности насекомых к инсектицидам // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2006. № 8. С. 7-12.

14. Соколянская М. П., Амирханов Д. В. Эстеразные механизмы формирования резистентности у комнатной мухи (*Musca domestica*) к инсектицидам разных химических классов // Агрехимия. 2008. № 7. С. 56-61.

15. Соколянская М. П. Токсикологическая и биохимическая характеристика процесса формирования резистентности у комнатной мухи (*Musca domestica* L.) к современным инсектицидам: Специальность 03.00.09. Энтомология: автореферат дисс. на соиск. уч. ст. кандид. биол. наук.

16. Тихова Г. П. Значение и интерпретация ошибки среднего в клиническом исследовании и эксперименте // Региональная анестезия и лечение острой боли. 2013. Т. 7. № 3. С. 50-53.

17. Abbas N., Shad S.A., Ismail M. Resistance to Conventional and New Insecticides in House Flies (Diptera: Muscidae) From Poultry Facilities in Punjab, Pakistan // *Journal of Economic Entomology*. 2015. V. 108 (2). P. 826-833.
18. A Comparative Study of Inhibitory Properties of Saponins (derived from *Azadirachta indica*) for Acetylcholinesterase of *Tribolium castaneum* and *Apis mellifera* / A. J. Sami, S. Bilal, M. Khalid [et al.] // *Pakistan journal of zoology*. 2018. V. 50(2). P. 725-733.
19. A comprehensive review of environmental fate and degradation of fipronil and its toxic metabolites / N. S. Singh, R. Sharma, S. K. Singh [et al.] // *Environ Res*. 2021. V. 199. № 111316. P. 1-15.
20. Ahmadi E., Khajehali J. Dichlorvos Resistance in the House Fly Populations, *Musca domestica*, of Iranian Cattle Farms // *Journal of arthropod-borne diseases*. 2020. V. 14(4). P. 344-352.
21. Ahmed S., Wilkins R. M. Studies on some enzymes involved in insecticide resistance in fenitrothion-resistant and -susceptible strains of *Musca domestica* L. (Dipt, Muscidae) // *Journal of applied entomology*. 2002. V. 126(9). P. 510-516.
22. Althalji M., Gorgun S. Purification and characterization of an esterase from larval *Diplolepis fructuum* (Rubsamen, 1895) (Hymenoptera: Cynipidae) // *Turkiye entomoloji dergisi-turkish journal of entomology*. 2019. V. 43(4). P. 367-376.
23. Amino acid substitutions of acetylcholinesterase associated with carbofuran resistance in *Chilo suppressalis* / C. Chang, X. Cheng, X. Y. Huang [et al.] // *Pest management science*. 2014. V. 70(12). P. 1930-1935.
24. An insect acetylcholinesterase biosensor utilizing WO₃/g-C₃N₄ nanocomposite modified pencil graphite electrode for phosmet detection in stored grains / S. Bilal, M. M. Hassan, M. F. U. Rehman [et al.] // *Food chemistry*. 2021. V. 346. № 128894. P. 1-10.

25. Arora S., Kumar A. Binary combinations of organophosphorus pesticides exhibit differential toxicity under oxidised and un-oxidised conditions // *Ecotoxicology and environmental safety*. 2015. V. 115. P. 93-100.
26. Bacterial Expression and Kinetic Analysis of Carboxylesterase 001D from *Helicoverpa armigera* / Y. Li, J. Liu, M. Lu [et al.] // *International journal of molecular sciences*. 2016. V. 17(4). P. 1-13.
27. Badiou A., Brunet J. L., Belzunces L. P. Existence of two membrane-bound acetylcholinesterases in the honey bee head // *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2007. V. 66(3). P. 122-134.
28. Binary combinations of organophosphorus and synthetic pyrethroids are more potent acetylcholinesterase inhibitors than organophosphorus and carbamate mixtures: An in vitro assessment / S. Arora, S. Balotra, G. Pandey [et al.] // *Toxicology letters*. 2017. V. 268. P. 8-16.
29. Biochemical characterization of two distinct acetylcholinesterases possessing almost identical catalytic activity in the damselfly *Vestalis gracilis* / K. Y. Ho, D. Kwon, L. Hyeock [et al.] // *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2013. V. 16(4). P. 465-471.
30. Biological responses in *Musca domestica* to chronic fipronil and chlorfenapyr exposures / P. A. Shumilova, E. A. Silivanova, N. A. Sennikova [et al.] // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. V. 12(4). P. 1-10.
31. Bis-isoquinolinium and bis-pyridinium acetylcholinesterase inhibitors: in vitro screening of probes for novel selective insecticides / V. Hrabcova, J. Korabecny, B. Manyova [et al.] // *RSC Advances*. 2017. V. 7(62). P. 39279-39291.
32. Brown A. M. A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet // *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2001. V.65(3). P. 191-200.
33. *BusinesStat* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://businessstat.ru/news/pesticides/>, свободный – (24.02.2022).

34. Cao Y., Herrero-Nogareda L., Cedergreen N. A comparative study of acetylcholinesterase and general-esterase activity assays using different substrates, in vitro and in vivo exposures and model organisms // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. № 109954. P. 1-10.
35. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio* / C. S. Marinho, M. V. F. Matias, I. G. F. Brandao [et al.] // *Comparative biochemistry and physiology c-toxicology & pharmacology*. 2019. V. 222. P. 11-18.
36. Characterization of acetylcholinesterase from elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* and QSAR of temephos derivatives against its activity / M. Sharifi, M. Ghadamyari, K. Gholivand [et al.] // *Pesticide biochemistry and physiology*. 2017. V. 136. P. 12-22.
37. Characterization of brain acetylcholinesterase of benthic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring / M. C. Araujo, C. R. D. Assis, K. C. C. Silva [et al.] // *Aquatic toxicology*. 2018. V. 205. P. 213-226.
38. Chlorfenapyr (A Pyrrole Insecticide) Applied Alone or as a Mixture With Alpha-Cypermethrin for Indoor Residual Spraying Against Pyrethroid Resistant *Anopheles Gambiae* Sl: An Experimental Hut Study in Cote d'Ivoire, Benin / N. Corine, C. Ngufor, J. Critchley [et al.] // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 9. P. 1-14.
39. Comparative studies of acetylcholinesterase purified from three field populations of *Liposcelis entomophila* (Enderlein) (Psocoptera: Liposcelididae) / L.-S. Xiao, W. Dou, Y. Li [et al.] // *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2010. V. 75(3). P. 158-173.
40. Comparison of inhibition kinetics of several organophosphates, including some nerve agent surrogates, using human erythrocyte and rat and mouse brain acetylcholinesterase / A. Coban, R. L. Carr, H. W. Chambers [et al.] // *Toxicology letters*. 2016. V. 248. P. 39-45.

41. Design, synthesis and evaluation of novel nonquaternary and 3 non-oxime reactivators for acetylcholinesterase inhibited by organophosphates / H. L. Bi, Q. Ouyang, Z. Wei [et al.] // *Bioorganic chemistry*. 2020. V. 100. № 103902. P. 1-12.
42. Detection and geographical distribution of the organophosphate resistance-associated Delta 3Q ace mutation in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) / E. G. Kakani, E. Sagri, M. Omirou [et al.] // *Pest management science*. 2014. V. 70(5). P. 743-750.
43. Detection of Chemical Weapon Agents Using Spectroscopic Probes: A Computational Study / L. S. Braga, E. F. Silva, D. T. Mancini [et al.] // *Journal of chemistry*. 2020. V. 2020. № 1312403. P. 1-10.
44. Differences in larval pesticide tolerance and esterase activity across honey bee (*Apis mellifera*) stocks / J. P. Milone, F. D. Rinkevich, A. McAfee [et al.] // *Ecotoxicology and environmental safety*. 2020. V. 206. P. 1-10.
45. Different response of acetylcholinesterases in salt- and detergent-soluble fractions of honeybee haemolymph, head and thorax after exposure to diazinon / G. Glavan, M. Kos, J. Božič [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2018. V. 205. P. 8-14.
46. Diversity and frequencies of genetic mutations involved in insecticide resistance in field populations of the house fly (*Musca domestica* L.) from China / Q. M. Wang, M. Li, J. Pan [et al.] // *Pesticide biochemistry and physiology*. 2012. Volume 102(2). P. 153-159.
47. Drug-1,3,4-Thiadiazole Conjugates as Novel Mixed-Type Inhibitors of Acetylcholinesterase: Synthesis, Molecular Docking, Pharmacokinetics, and ADMET Evaluation / R. Ujan, A. Saeed, P. A. Channar [et al.] // *Molecules*. 2019. V. 24(5). № 860. P. 1-10.
48. Esterase-mediated spinosad resistance in house flies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) / Y. Zhang, M. Guo, Z. Ma [et al.] // *Ecotoxicology*. 2020. V. 29(1). P. 35-44.

49. Evaluation of a Brain Acetylcholinesterase Extraction Method and Kinetic Constants after Methyl-Paraoxon Inhibition in Three Brazilian Fish Species / A. P. Freitas, C. R. Santos, P. N. Sarcinelli [et al.] // PLoS One. 2016. V. 11(9). № e0163317. P. 1-10.

50. Evaluation of Resistance to Some Pyrethroid and Organophosphate Insecticides and Their Underlying Impact on the Activity of Esterases and Phosphatases in House Fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) / K. Ranian, M. K. Zahoor, M. A. Zahoor [et al.] // Polish journal of environmental studies. 2021. V. 30(1). P. 327-336.

51. Evaluation of the pyrrole insecticide chlorfenapyr against pyrethroid resistant and susceptible *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) / S. V. Oliver, M. L. Kaiser, O. R. Wood [et al.] // Wiley Online Library. 2010. V. 15. № 1. P. 127-131.

52. Experimental Hut Evaluation of the Pyrrole Insecticide Chlorfenapyr on Bed Nets for the Control of *Anopheles Arabiensis* and *Culex Quinquefasciatus* / F. W. Mosha, I. N. Lyimo, R. M. Oxborough [et al.] // Wiley Online Library. 2008. V. 13(5). P. 644-652.

53. Expression of the housefly acetylcholinesterase in a bioreactor and its potential application in the detection of pesticide residues / G.-J. Lang, J.-Y. Shang, Y.-X. Chen [et al.] // World journal of microbiology & biotechnology. 2010. V. 26(10). P. 1795-1801.

54. Farooq M., Freed S. Mortality, Biological, and Biochemical Response of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to Selected Insecticides // Journal of entomological science. 2018. V. 53(1). P. 27-45.

55. Feng X., Li M., Liu N. Carboxylesterase genes in pyrethroid resistant house flies, *Musca domestica* // Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2018. V. 92. P. 30-39.

56. Feng X., Liu N. Functional Analyses of House Fly Carboxylesterases Involved in Insecticide Resistance // Frontiers in physiology. 2020. V. 11. P. 1-11.

57. First principles calculations of thermodynamics and kinetic parameters and molecular dynamics simulations of acetylcholinesterase reactivators: can mouse data provide new insights into humans? / K. S. Matos, E. F. F. da Cunha, A. D. Goncalves [et al.] // *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2012. V. 30(5). P. 546-558.

58. Foil L. D., Guerrero F. D., Bendele K. G. Detection of Target Site Resistance to Pyrethroids and Organophosphates in the Horn Fly Using Multiplex Polymerase Chain Reaction // *Journal of medical entomology*. 2010. V. 47(5). P. 855-861.

59. Frequency of Pyrethroid Insecticide Resistance kdr Gene and Its Associated Enzyme Modulation in Housefly, *Musca domestica* L. Populations From Jhang, Pakistan / B. Riaz, M. K. Zahoor, K. Malik [et al.] // *Frontiers in environmental science*. 2022. V. 9. № 806456. P. 1-15.

60. Functional analysis and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the German cockroach, *Blattella germanica* / Y. H. Kim, J. Y. Choi, Y. H. Je [et al.] // *Insect molecular biology*. 2010. V. 19(6). P. 765-776.

61. Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* / L. Grigoraki, V. Balabanidou, C. Meristoudis [et al.] // *Insect biochemistry and molecular biology*. 2016. V. 74. P. 61-67.

62. Functional characterization of carboxylesterase gene mutations involved in *Aphis gossypii* resistance to organophosphate insecticides / Y. Gong, G. Ai, M. Li [et al.] // *Insect molecular biology*. 2017. V. 26(6). P. 702-714.

63. Fundação O. C. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti* // Ministry of Health of Brazil. Brasília: Ministério da Saúde. 2006. 128 p.

64. Genomic structure, organization and localization of the acetylcholinesterase locus of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* / E. G. Kakani, M.

Trakala, E. Drosopoulou [et al.] // Bulletin of entomological research. 2013. V. 103(1). P. 36-47.

65. Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini) / C. F. Fardergomes, K. M. Fernandes, R. C. Bernardes [et al.] // Sci Total Environ. 2021. P. 1-10.

66. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance / S. B. Walsh, T. A. Dolden, G. D. Moores [et al.] // Biochemical journal. 2001. V. 359. Pt. 1. P. 175-181.

67. Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* / R. Poupardin, W. Srisukontarat, C. Yunta [et al.] // PLoS Negl Trop Dis. 2014. V. 8(3). P. 1-11.

68. Impact of 2,4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) / T. J. D. S. Pinto, R. A. Moreira, L. C. M. D. Silva [et al.] // Ecotoxicol Environ Saf. 2021. V. 209. № 111778. P. 1-10.

69. Inheritance mode and mechanisms of resistance to imidacloprid in the house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from China / Z. Ma, J. Li, Y. Zhang [et al.] // PLoS One. 2017. V. 12(12). № e0189343. P. 1-10.

70. Inhibition Kinetics of 16 Organophosphorus Pesticides or Their Active Metabolites on Erythrocyte Acetylcholinesterase From Humans and Rats / E. C. Meek, R. Reiss, J. A. Crow [et al.] // Toxicological sciences. 2021. V. 183(2). P. 404-414.

71. Inhibitory activities of flavonoids from *Eupatorium adenophorum* against acetylcholinesterase / M. Y. Li, X. Gao, M. X. Lan [et al.] // Pesticide biochemistry and physiology. 2020. V. 170. № 104701. P. 1-10.

72. Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action classification – a tool for resistance management / T. C. Sparks, A. J. Crossthwaite, R. Nauen [et al.] // Pesticide biochemistry and physiology. 2020. V. 167. P. 1-10.

73. In silico approaches to evaluate the molecular properties of organophosphate compounds to inhibit acetylcholinesterase activity in housefly / P.

Marimuthu, Y.-J. Lee, B. Kim [et al.] // Journal of biomolecular structure & dynamics. 2019. V. 37(2). P. 307-320.

74. Isik M. High Stability of Immobilized Acetylcholinesterase on Chitosan Beads // Chemistryselect. 2020. V. 5(15). P. 4623-4627.

75. Khan H. A. A., Akram W., Ali S. Activities of Select Enzymes Involved in Insecticide Resistance in Spinosad-Resistant and -Susceptible Strains of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) // Journal of Medical Entomology. 2019. V. 57(2) P. 620-622.

76. Khan H. A. A., Akram W. Cyromazine resistance in a field strain of house flies, *Musca domestica* L.: Resistance risk assessment and bio-chemical mechanism // Chemosphere. 2017. V. 167. P. 308-313.

77. Kim Y. H., Lee S. H. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? // Insect biochemistry and molecular biology. 2013. V. 43(1). P. 47-53.

78. Kinetic analysis of acetylcholinesterase in a propoxur-resistant strain of housefly (*Musca domestica*) from Shanghai, China / M. A. Shi, J. Z. Yuan, J. Wu [et al.] // Pesticide biochemistry and physiology. 2002. V. 72(2). P. 72-82.

79. Klichkhanov N. K., Dzhafarova A. M., Al-Rabeei M. A. M. Kinetic Characteristics of Acetylcholinesterase and Structural-Functional State of the Rat Erythrocyte Membranes at Moderate Hypothermia // Biologicheskiemembrany. 2017. V. 34(3). P. 201-214.

80. Lang G. J., Zhu K. Y., Zhang C. X. Can Acetylcholinesterase Serve as a Target for Developing More Selective Insecticides? // Current drug targets. 2012. V. 13(4). P. 495-501.

81. Lee S.-N., Kim J. H., Lee S.-B. Internal Diffusion-Controlled Enzyme Reaction: The Acetylcholinesterase Kinetics // Journal of chemical theory and computation. 2012. V. 8(2). P. 715-723.

82. Linkage analysis of an acetylcholinesterase gene in the house fly *Musca domestica* (Diptera :Muscidae) / T. Kozaki, T. Shono, T. Tomita [et al.] // *Journal of economic entomology*. 2002. V. 95(1). P. 129-133.
83. Li Q., Huang J., Yuan J. Status and preliminary mechanism of resistance to insecticides in a field strain of housefly (*Musca domestica*, L) // *Revista Brasileira de Entomologia*. 2018. V. 62(4). P. 311-314.
84. Marasovic M., Marasovic T., Milos M. Robust Nonlinear Regression in Enzyme Kinetic Parameters Estimation // *Journal of Chemistry*. V. 2017. ID 6560983. P. 1-12.
85. Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia / I. Fonseca-Gonzalez, M. L. Quinones, J. McAllister [et al.] // *Memorias do instituto Oswaldo Cruz*. 2009. V. 104(1). P. 18-26.
86. Molecular and Kinetic Properties of Two Acetylcholinesterases from the Western Honey Bee, *Apis mellifera* / Y. H. Kim, D. J. Cha, J. W. Jung [et al.] // *PLoS One*. 2012. V. 7(11). № 48838. P. 1-10.
87. Molecular docking and in vitro evaluation of a new hybrid molecule (JM-20) on cholinesterase activity from different sources / F. D. da Silva, P. A. Nogara, E. Ochoa-Rodriguez [et al.] // *Biochimie*. 2020. V. 168. P. 297-306.
88. Molecular modeling and in vitro reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents / J. O. S. Giacoppo, T. C. C. Franca, K. Kuca [et al.] // *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2015. V. 33(9). P. 2048-2058.
89. Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L) / D. Fournier, A. Cuany, J. M. Bride [et al.] // *Journal of neurochemistry*. 1987. V. 49(5). P. 1455-1461.
90. Mosquitocidal carbamates with low toxicity to agricultural pests: an advantageous property for insecticide resistance management / D. R. Swale, P. R. Carlier, J. A. Hartsel [et al.] // *Pest management science*. 2015. V. 71(8). P. 1158-1164.

91. Multiple Genetic Mutations Related to Insecticide Resistance are Detected in Field Kazakhstani House Flies (Muscidae: Diptera) / R.-N. Qu, J. Zhu, M. Li [et al.] // *Journal of medical entomology*. 2021. V. 58(6). P. 2338-2348.
92. Multiple Resistances Against Formulated Organophosphates, Pyrethroids, and Newer-Chemistry Insecticides in Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan / M. A. Qayyum, W. Wakil, M. J. Arif [et al.] // *Journal of Economic Entomology*. 2015 V.108 (1). P. 286-293.
93. Mutations in acetylcholinesterase genes of *Rhopalosiphumpadi* resistant to organophosphate and carbamate insecticides / M.-H. Chen, Z.-J. Han, X.-F. Qiao [et al.] // *Genome*. 2007. V. 50(2). P. 172-179.
94. New Nanospheres to Use in the Determination of ImidanPhosmet and Vantex Pesticides / E. Karmaz, E. H. Ozkan, N. K. Yetim [et al.] // *Journal of inorganic and organometallic polymers and materials*. 2021. V. 31(7). P. 2915-2924.
95. Oral Delivery Mediated RNA Interference of a Carboxylesterase Gene Results in Reduced Resistance to Organophosphorus Insecticides in the Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover / Y.-H. Gong, X.-R. Yu, Q.-L. Shang [et al.] // *PLoS One*. 2014. V. 9(8). P. 1-9.
96. Organophosphate and pyrethroid hydrolase activities of mutant Esterases from the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* / Y. Li, C. A. Farnsworth, C. W. Coppin [et al.] // *PLoS One*. 2013. V. 8(10). P. 1-7.
97. Organophosphate Insecticides Resistance in Field Populations of House Flies, *Musca domestica* L.: Levels of Resistance and Acetylcholinesterase Activity / Y. Abobakr, F. I. Al-Hussein, A. E. Bayoumi [et al.] // *Insects*. 2022. V. 13(2). № 192. P. 1-10
98. PCR-RFLP methods for detection of insecticide resistance-associated mutations in the housefly (*Musca domestica*) / X-H. Qiu, J. Pan, M. Li [et al.] // *Pesticide biochemistry and physiology*. 2012. V. 104(3). P. 201-205.
99. Pharmacogenetic Regulation of Acetylcholinesterase Activity in *Drosophila* Reveals the Regulatory Mechanisms of AChE Inhibitors in Synaptic

Plasticity / W. Kim, D. Lee, J. Choi [et al.] // *Neurochemical research*. 2011. V. 36(5). P. 879-893.

100. Polymorphism in the acetylcholinesterase gene of *Musca domestica* L. field populations in Turkey / S. Baskurt, B. G. Taskin, E. Dogac [et al.] // *Journal of vector ecology*. 2011. V. 36(2). P. 248-257.

101. Prediction of dose-dependent in vivo acetylcholinesterase inhibition by profenofos in rats and humans using physiologically based kinetic (PBK) modeling-facilitated reverse dosimetry / I. Omwenga, S. S. Zhao, L. Kanja [et al.] // *Archives of toxicology*. 2021. V. 95(4). P. 1287-1301.

102. Propoxur resistance associated with insensitivity of acetylcholinesterase (AChE) in the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) / C. M. You, C. Shan, J. J. Xin [et al.] // *Scientific reports*. 2020. V. 10(1). № 8400. P. 1-7.

103. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. 1951. V. 193(1). P. 265-275.

104. Purification and characterization of acetylcholinesterase from oriental fruit fly [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] (Diptera: Tephritidae) / Y. M. Hsiao, J. Y. Lai, H. Y. Liao [et al.] // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004. V. 52(17). P. 5340-5346.

105. Purification and characterization of acetylcholinesterase in *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) / M. A. Mohamed, S. Shaalan, A.-E. M. Ghazy [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. 2020. V. 147. P. 1029-1040.

106. Quantitative and qualitative changes of the carboxylesterase associated with beta-cypermethrin resistance in the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) / L. Zhang, J. Shi, X. Shi [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2010. V. 156(1). P. 6-11.

107. Resistance to Fipronil in the Common Bed Bug (Hemiptera: Cimicidae) / M. A. González-Morales, Z. deVries, A. Sierras [et al.] // J Med Entomol. 2021. V. 58(4). P. 798-1807.

108. Rosenberry T. L. Strategies to Resolve the Catalytic Mechanism of Acetylcholinesterase // Journal of molecular neuroscience. 2010. V. 40(1-2). P. 32-39.

109. Selection and reversion of azamethiphos-resistance in a field population of the housefly *Musca domestica* (Diptera :Muscidae), and the underlying biochemical mechanisms / M. Kristensen, M. Knorr, A. G. Spencer [et al.] // Journal of economic entomology. 2000. V. 93(6). P. 1788-1795.

110. Serebrov V. V., Bakhvalov S. A., Glupov V. V. Induction of esterases in larvae of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) during infection by fungus *metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOR // Euroasian entomological journal. 2005. V. 4(1). P. 9-11.

111. Soluble esterases as biomarkers of neurotoxic compounds in the widespread serpulid *Ficopomatus enigmaticus* (Fauvel, 1923) / V. Casu, F. Tardelli, L. de Marchi [et al.] // Journal of environmental science and health part B-pesticides food contaminants and agricultural wastes. 2019. V. 54(11). P. 883-891.

112. Stojan J. Conformational rigidity of cholinesterases allows for the prediction of combined effects in a particular double mutant // Chemico-biological interactions. 2016. V. 259(SI). Part B. P. 110-114.

113. Susceptibility of *Anopheles gambiae* from Cote d'Ivoire to insecticides used on insecticide-treated nets: evaluating the additional entomological impact of piperonyl butoxide and chlorfenapyr / B. L. Kouassi, E. Constant, E. Tia [et al.] // Malaria journal. 2020. T. 19. V. 1. № 454. P. 1-11.

114. Taskin V., Kence M. The genetic basis of malathion resistance in housefly (*Musca domestica* L.) strains from Turkey // Russian journal of genetics. 2004. V. 40(11). P. 1215-1222.

115. Temeyer K. B., Chen A. C. Identification and characterization of a cDNA encoding the acetylcholinesterase of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) // DNA sequence. 2007. V. 18(2). P. 85-91.

116. The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* strains: Purification and characterization of two acetylcholinesterases / M. A. Mohamed, E. M. E. Mahdy, A. M. Ghazy [et al.] // *Comparative biochemistry and physiology c-toxicology & pharmacology*. 2016. V. 180. P. 11-22.
117. The Activity of the Pyrrole Insecticide Chlorfenapyr in Mosquito Bioassay: Towards a More Rational Testing and Screening of Non-Neurotoxic Insecticides for Malaria Vector Control / R. M. Oxboroug, R. N'Guessan, R. Jones, [et al.] // *Part of Springer Nature*. 2015. V. 14. № 124. P. 1-11.
118. The overexpression and variant of CYP6G4 associated with propoxur resistance in the housefly, *Musca domestica* L. / C. M. You, C. Shan, Z. Ma [et al.] // *Pest management science*. 2021.V. 77(10). P. 4321-4330.
119. Thiamethoxam Resistance in the House Fly, *Musca domestica* L.: Current Status, Resistance Selection, Cross-Resistance Potential and Possible Biochemical Mechanisms / H. A. A. Khan, W. Akram, J. Iqbal [et al.] // *PLoS One*. 2015. V. 10(5). P. 1-9.
120. Time-course of human cholinesterases-catalyzed competing substrate kinetics / A. R. Mukhametgalieva, A. R. Aglyamova, S. V. Lushchekina [et al.] // *Chemico-biological interactions*. 2019. V. 310. № 108702. P. 1-10.
121. Time of Day-Specific Changes in Metabolic Detoxification and Insecticide Tolerance in the House Fly, *Musca domestica* L. / C. M. You, Z. L. Li, Y. Z. Yin [et al.] // *Frontiers in physiology*. 2022. V. 12. № 803682. P. 1-7.
122. Toxicokinetic analysis of commonly used pesticides using data on acute poisoning cases from Hyderabad, South India / S. N. Sinha, K. R. Kumar, R. Ungarala [et al.] // *Chemosphere*. 2021. V. 268. № 129488. P. 1-10.
123. Transcriptome Profiling and Genetic Study Reveal Amplified Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance, in the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus* / L. Grigoraki, J. Lagnel, I. Kioulos [et al.] // *PLoS Negl Trop Dis*. 2015. V. 9(5). P. 1-17.

124. Weetman D., Djogbenou L. S., Lucas E. Copy number variation (CNV) and insecticide resistance in mosquitoes: evolving knowledge or an evolving problem? // *Current Opinion in Insect Science*. 2018. V. 27. P. 82-88.

125. Xie R.-L., Mei X.-D., Ning J. Design, Synthesis and Insecticide Activity of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors: Triazolinone and Phthalimide Heterodimers // *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2019. V. 67(4). P. 345-350.

126. Zhang L., Gao X., Liang P. Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2007. V. 89(1). P. 65-72.

