

13

На правах рукописи

РГБ ОД

67 442 2000

САЛТЫКОВА Елена Станиславовна

АДАПТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ
НА APIS MELLIFERA L.

03.00.09 - энтомология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

111-

Санкт-Петербург - Пушкин - 2000

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

Научные руководители:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник А.Г.Николенко

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Р.М.Хайруллин

Официальные оппоненты:

доктор сельскохозяйственных наук, профессор Н.А.Вилкова

кандидат биологических наук, доцент А.Г.Семенова

Ведущая организация: Башкирский государственный аграрный университет

Защита диссертации состоится «13» Зиваре 2000 г в 10⁰⁰ час. в заседании диссертационного совета Д020.01.01 при Всероссийском научном исследовательском институте защиты растений РАСХН по адресу: 189620, Санкт-Петербург-Пушкин - 6, шоссе Подбельского, 3, ВИЗР.

С диссертацией можно познакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

Автореферат разослан «10» декабре 1999 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Г.А.Наседкина

М
E902.512.2,0 1 17691-2,0
2 17871.71-35,0

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Выявление механизмов адаптации живых организмов неблагоприятным воздействиям окружающей среды является одной из центральных проблем современной биологии. Изучение молекулярных механизмов защитных реакций насекомых позволит более целенаправленно подойти как к проблеме повышения устойчивости хозяйственно полезных видов насекомых, так к проблеме регуляции численности насекомых-вредителей.

Медоносная пчела обладает хорошо развитой индивидуальной и групповой системами защиты, которые, однако, полностью реализуются только при благоприятных условиях. К резкому снижению природной устойчивости пчел в настоящее время приводят сокращение кормовой базы, интенсивная межпородная бридизация, повышение загрязненности окружающей среды и другие причины. Одним из эффективных способов восстановления устойчивости пчел является применение биостимуляторов (Шангараева, 1998). Однако, в современном пчеловодстве преобладает применение минерально-витаминных добавок, которые эффективны, как правило, только при низком уровне пчеловождения. Такие добавки компенсируют недостатки искусственного рациона (сахарный сироп), однако они практически бесполезны при полноценном питании пчел.

Перспективным направлением в области биостимуляторов может стать изучение биологической активности промежуточных продуктов катаболизма эндонных биополимеров (Тарчевский, 1992). Наиболее распространенным у насекомых биополимером, как известно, является хитин. Адаптогенная роль производных хитина, в частности, хитослигосахаридов, показана рядом исследователей преимущественно на растениях (Ryan, 1991; Максимов, 1997), но практически не следована на насекомых. Это дает основание предположить их активное участие в регуляции обмена веществ, морфогенеза и иммунной реакции насекомых, хотя до последнего времени этот вопрос оставался неисследованным. В то же время изучение возможности применения олигомеров хитина в качестве адаптивов насекомых может положить начало созданию биостимуляторов нового по-

коления, действие которых обусловлено влиянием на биохимические системы адаптации.

Цель и задачи исследований. Цель работы заключалась в выявлении биологической активности хитоолигосахаридов по отношению к *Apis mellifera* L. и изучении их адаптивного действия на начальном этапе инфекционного процесса у пчелы. Были поставлены следующие задачи:

- 1 Провести сравнительный анализ биологической активности хитина, его олигомеров и мономера N-ацетил-D-глюкозамина (АГА) по отношению к *Apis mellifera*.
- 2 Изучить воздействие хитосахаридов на биохимические показатели, отражающие адаптивные процессы у *Apis mellifera*.
3. Для детального изучения адаптивных свойств хитоолигосахаридов (ХОС) построить физиолого-биохимическую модель начальной стадии инфекционного процесса у медоносной пчелы.
- 4 Исследовать преадаптивное действие ХОС на начальной стадии инфекционного процесса у медоносной пчелы на основе построенной модели.

Научная новизна. Впервые показана высокая биологическая активность производных хитина в отношении *Apis mellifera*. Установлена зависимость ответных реакций от размера углеводной молекулы (хитин, ХОС, АГА). Показана индукция новых молекулярных форм феноксидазной системы у насекомых, вызываемая исследуемыми веществами, сопоставимая с таковой при воздействии биотоксибациллина. Обнаружена способность хитоолигосахаридов и N-ацетил-D-глюкозамина влиять на скорость морфогенетических процессов. Впервые изучено преадаптивное действие ХОС на медоносную пчелу, в том числе на защитные биохимические реакции при развитии инфекционного процесса.

Практическая ценность работы. Полученные результаты могут быть использованы при создании препаратов нового поколения для пчеловодства, основанных на регуляции адаптивных биохимических процессов *Apis mellifera*, при разработке регламента их применения и апробация в производственных условиях.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конференциях: «Изучение, охрана и рациональное использование природных ресурсов» (Уфа, 1989); «Изучение и рациональное использование природных ресурсов» (Уфа, 1991); «Экологически-й императив сельского хозяйства Республики Башкортостан» (Уфа, 1998); «Biologically Active Polysaccharides» (Norway, Oslo, 1998); «3rd Carbohydrate Bioengineering Meeting» (England, 1999).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста, включая 20 таблиц и 15 рисунков, и состоит из введения, 6 глав, выводов и списка литературы, включающего 186 источников, в том числе 18 -иностранных.

Содержание работы

Глава 1. Биохимические механизмы адаптации насекомых.

Описаны известные физиолого-биохимические механизмы адаптации насекомых. Особо отмечены гуморальные факторы иммунитета насекомых. Показано, что формирование природной устойчивости у насекомых обусловлено целым рядом систем, которые принимают участие в процессах быстрой и долговременной адаптации.

Подробно рассмотрены: ферменты антиоксидантной защиты, регулирующие уровень активированных форм кислорода; агглютинины и антибактериальные пептиды; фенолоксидазная система, которая принимает участие в процессах меланизации и склеротизации покровов насекомых, а также в регуляции метаболизма биогенных аминов и иммунных реакциях; комплекс протеиназ, активизирующий проферменты. Анализируется роль этих систем в реализации механизмов быстрой адаптации.

Большое внимание в обзоре уделено олигомерам природных полисахаридов. Отмечена способность экзогенных и эндогенных олигосахаридов влиять на процессы метаболизма живых организмов, их регуляторные функции. Рассматривает-

ся их участие в запуске триггерных механизмов выживания при действии неблагоприятных факторов.

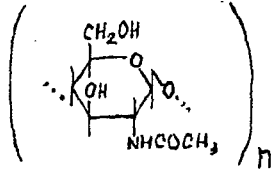
Глава 2. Материалы и методы исследований.

В качестве объектов исследований были использованы темная лесная (среднерусская) медоносная пчела *Apis mellifera mellifera* L., личинки мухи домашней *Musca domestica* L. и колорадского жука *Leptinotera decemlineata* Say. Трехсуточных личинок домашней мухи содержали в стеклянных садках объемом 250 мл на пшеничных отрубях по 20 особей в каждом. Личинок IV возраста колорадского жука содержали в чашках Петри диаметром 10 см по 10 особей на листьях картофеля. Летние рабочие пчелы, собранные на пасеках в июле-августе, содержались в садках из капронового сита 10x10x10 см по 20 особей согласно принятой методике (Еськов, 1990). Пчел собирали с одной пасеки из 5-10 ульев, при рассаживании в садки брали одинаковое количество пчел из разных ульев. До начала эксперимента пчелы выдерживались в садках не менее недели. Каждый эксперимент проводился в двукратной повторности на вариант. Общее количество особей в эксперименте в зависимости от числа вариантов составляло 80-200. Все насекомые содержались при стандартной температуре (+25°C) и 18 часовом световом дне.

В экспериментах с мухой домашней и колорадским жуком использовался строго датированный биологический материал, поэтому развитие личинок при стандартных условиях содержания было синхронным. В эксперименте с домашней мухой использовали трехсуточных личинок из кладок взятых с разницей во времени откладки яиц не более четырех часов. А в эксперименте с колорадским жуком использовали личинок отобранных в лабораторных условиях через сутки после линьки на четверть возраст. В эксперименте фиксировали начало линьки на следующую стадию развития насекомого.

В качестве биологически активных веществ исследовались: очищенный порошкообразный хитин (Fluka), смесь ХОС с молекулярной массой от 1500 до

1000 Д (5-20 звеньев) и степенью ацетилирования 70% (Хайруллин, 1992) и АГА Serva).



В предварительных экспериментах по влиянию различных концентраций хитосахаридов на выживаемость пчел и на изучаемые физиолого-биохимические показатели установлено, что оптимальной концентрацией для дальнейших исследований является 0,001%. Вещества добавляли в сахарный сироп, который давали пчелам в течение трех суток. Контрольные насекомые содержались на обычном сахарном сиропе. После этого насекомых 12 часов выдерживали без корма. Искусственное инфицирование насекомых проводили в течение последующих суток, добавляя в корм препарат битоксибациллина (БТБ) (продуцент *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*) в концентрации CK_{50} 0,5% для рабочей пчелы (0,01% для личинок мух, 0,1% для личинок колорадского жука). Личинкам мух исследуемые вещества добавляли в отруби, для личинок колорадского жука хитосахариды и БТБ наносили на листья картофеля методом погружения в водную суспензию на 10 сек. При действии соединений на насекомое выживаемость определяли на пятые сутки. В эксперименте по исследованию воздействия экстремальных температур (+50°C и -2°C) визуально регистрировалась поведенческая реакция пчел и отмечалось начало наступления фазы гиперактивности (повышенная двигательная активность) или холодового оцепенения (полное прекращение локомоции) (Еськов, 1990).

В качестве биохимических показателей адаптивности использовали:

- активность ферментов антиокислительной защиты организма (каталазы и пероксидазы) и, как итоговый результат работы блока, контролирующего уровень свободных радикалов и активных форм кислорода, концентрацию конечных продуктов окисления по содержанию малонового диальдегида (МДА);
- активность фенолоксидазного (ФО) комплекса и регулирующих ее сериновых протеиназ и их ингибиторов (ИП), принимающего участие в меланизации кути-

кулы, в процессе распознавания и инкапсуляции чужеродных тел и регуляции уровня биогенных аминов;

- содержание эндогенных гликозаминогликанов (ГАГ), участвующих в процессах гликоконъюгации - связывании токсичных для организма продуктов, а также в репаративных процессах;
- активность хитиназы, являющейся одним из ключевых факторов метаболизма хитина и его производных;
- активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), как интегрального показателя интенсивности процессов углеводного обмена и окислительно-восстановительных реакций, заинтересованных в НАДФ Н₂, в организме.

Для определения активности Г6ФДГ использовали методику Ю.Б.Филипповича (1978). Активность каталазы определяли по В.М.Мершиев (1983). Содержание малонового диальдегида измеряли по Д.И.Стальной Т.Г.Гаришвили (1977). Содержание гликозаминогликанов и свободных уроновых кислот определяли по П.Н.Шараеву (1987). Калибровочную прямую строили на геларину. Активность пероксидазы измеряли по А.Н.Бояркину (1951). Фоактивность определяли по Ю.Б.Филипповичу (1978). Уровень активности сериновых протеиназ и их ингибиторов определяли по S.J.Saul (1989). Концентрацию белков определяли по Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА). Электрофорез множественных молекулярных форм феноксидаз проводили в ПААГ по системе V.J.Devis (1962). Выявление ферментативной активности на электрофореграммах осуществляли по методике описанной Г.Ю.Раушенбах (1997). Для электрофореза использовали общий гомогенат из 1 особи в расчете 100 мг биоматериала на 1 мл экстрагирующего буфера.

Глава 3. Биологическая активность хитина, его олигомеров и мономера N-ацетил-D-глюкозамина для насекомых.

3.1. Влияние производных хитина на выживание *Apis mellifera*. После подкормки пчел хитином, ХОС и АГА выживаемость в двух последних вариантах

значительно превышала контрольный уровень. Особенно наглядно это видно на 16 и 23 сутки после начала эксперимента (рис.1). Традиционные минеральные добавки увеличивают выживаемость пчел в значительно меньшей степени (Шагул, 1983). Аналогичным образом действие производных хитина повышало долю мух, прошедших полный цикл развития до имаго.

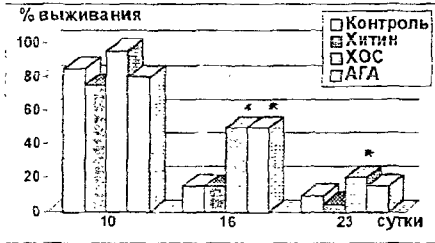


Рисунок 1 Выживаемость пчел при содержании в садках (* - различие опыта с контролем достоверно, $p > 0.95$).

3.2. Преадаптивное действие ХОС при действии экстремальных температур (+50°C и +2°C). При действии экстремальных температур на пчел, предварительно содержавшихся на сиропе с добавлением ХОС, наблюдалось сохранение нормальной реакции в течение всех 30 мин эксперимента (рис. 2). Добавление в сироп АГА не давало существенных различий с контрольными насекомыми.

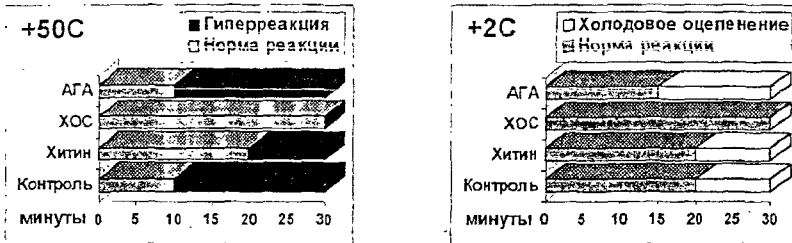


Рисунок 2. Физиологическая реакция пчел на экстремальные температуры (+50°C и +2°C)

Использование ХОС и АГА в качестве подкормки повышало выживаемость пчел после температурного воздействия, в то время как добавление в корм хитина приводило к повышенной смертности насекомых.

3.3. Преадаптивное действие хитосахаридов при бактериальном заражении насекомых. После заражения БТБ

на 5 сутки в садках выживало только 35% пчел (рис. 3). Предварительное содержание пчел на сиропе с добавками хитосахаридов в различной степени компенсировало последующее негативное воздействие БТБ. При использовании ХОС выживаемость пчел в эксперименте была практически на уровне контроля.

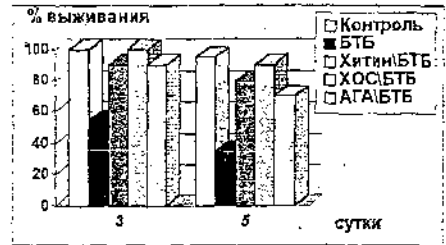


Рисунок 3. Процент выживания пчел в садках на 5 сутки после заражения БТБ (вариант с БТБ достоверно отличается от остальных, $p > 0.95$)

3.4. Влияние хитосахаридов на онтогенез насекомых. Добавка хитосахаридов в корм личинок домашней мухи и колорадского жука сокращало время развития насекомых (рис.4.). При этом процент выхода имаго снижался в варианте с хитином и оставался на уровне не ниже контроля в вариантах с ХОС и АГА.

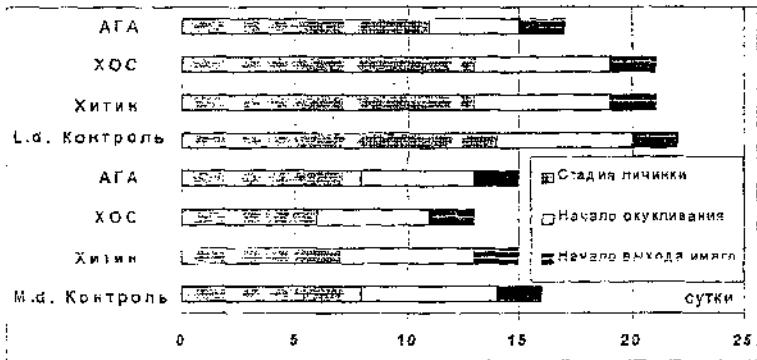


Рисунок 4. Влияние хитосахаридов на онтогенез домашней мухи (M.d.) и колорадского жука (L.d.) Сроки развития личинок мух рассчитывались от трехсуточной личинки до куколки, для колорадского жука учитывали продолжительность развития личинок четвертого возраста.

Внесение в среду для развития личинок домашней мухи БТБ (0,01%) на стадии 6 суточных личинок почти в 3 раза снижало выход имаго. Компенсаторное действие обнаружено только в варианте с АГА. В этом варианте выживаемость имаго снизилась только на 20% по сравнению с контролем. При внесении БТБ в

реду на стадии начала образования пупариев максимальное преимущество получили насекомые в варианте с ХОС, в 2 раза меньше в варианте с хитином, тогда как вариант без предварительной подкормки (только БТБ) и вариант с АГА оказались полностью безуспешными. ХОС и хитин, по нашим наблюдениям, повышали жорость морфогенеза.

Аналогичный эксперимент проводили на личинках колорадского жука, 5 суток получавших корм, обработанный хитином, ХОС или АГА (0,001%), а затем - БТБ (0,1%). Развитие патогенного процесса и иммунного ответа, о котором мы судили по активности ФО в динамике, начиная с 4-х часов после начала действия БТБ, сопровождалось и для этого вида изменениями скорости морфогенеза, прием хитин, также как и в экспериментах с синхронизированной культурой комнатной мухи, сокращал стадию личиночного развития на 1 сутки, а АГА на 3 суток /скорил и выход имаго. В этом эксперименте явным компенсаторным эффектом обладал АГА, обеспечивший в 5 раз более высокую выживаемость имаго, чем в контрольной выборке.

Таким образом, нами впервые было показано, что хитин, хитоолигосахариды и N-ацетил-D-глюкозамин обладают выраженной биологической активностью по отношению к организму насекомых. При этом характер действия хитосахаридов зависел от размера молекулы и вида насекомого. Также было установлено что, хитин и его производные влияют на морфогенез домашней мухи и колорадского кука.

Глава 4. Действие хитосахаридов на биохимические показатели, отражающие адаптивные процессы у *Apis mellifera*.

При сравнении действия хитина и его производных на биохимические показатели у пчелы было отмечено снижение уровня образования вторичных продуктов перекисного окисления (МДА), наиболее низкие значения которого наблюдали при действии ХОС. Уровень образования эндогенных ГАГ в данном варианте

был наиболее высоким. Отмеченные явления сохранились при последующем дополнительном заражении БТБ (табл. 1.).

Аналогичные результаты были получены при изучении биохимических процессов под действием экстремальных температур на пчел.

Таблица 1.

Биохимические показатели состояния организма после подкормки пчел хитосахаридами и/или введения БТБ (биохимические показатели приведены по отношению к контролю)

Вариант	Каталаза	МДА	ФО	ГАГ	Уровни е кислоты	Г6ФДГ
Ед. измерений в эксперименте	мМ/мин/ мг белка	нМ/г ткани	ед.ак/ мг белка	мг/г ткани	мг/г ткани	мМ/мин/ мг белка
Хитин	1,44	0,75	2,38	7,00	0,34	1,42
ХОС	0,95	0,52	1,08	50,50	1,89	0,73
АГА	1,39	0,87	1,60	1,50	0,57	0,57
БТБ	1,99	2,94	1,15	5,50	0,61	0,57
Хитин/БТБ	1,66	0,65	1,01	10,00	1,00	1,00
ХОС/БТБ	1,88	0,49	1,76	12,50	0,61	1,76
АГА/БТБ	1,79	1,75	1,59	26,50	1,93	1,26

(в светлых клетках различие опыта с контролем достоверно, $p > 0,95$)

Добавление в корм личинок домашней мухи и колорадского жука в начале окукливания препарата БТБ и/или хитосахаридов инициировало индукцию появления новых молекулярных форм ФО. Спектр множественных молекулярных форм, индуцированных применением АГА и ХОС во многом был сходен с тем что возникал при действии БТБ (рис. 5). Можно предположить, что подобного рода изменения могут быть обусловлены усилением экспрессии гена профенолоксидазы и/или посттрансляционной модификацией.

Таким образом, выводы предыдущей главы были подтверждены на биохимическом уровне. Хитин, ХОС и АГА в относительно низкой концентрации (0,001%) активно воздействовали на биохимические процессы насекомых. При этом характер действия хитосахаридов также зависел от размера молекулы. Производные хитина инициировали появление дополнительных молекулярных форм

фенолоксидаз, идентичных тем, что образовывались при действии на насекомых бактериального препарата. Наибольшая степень адаптивного действия на *Apis mellifera* из испытанных хитосахаридов установлена для ХОС.

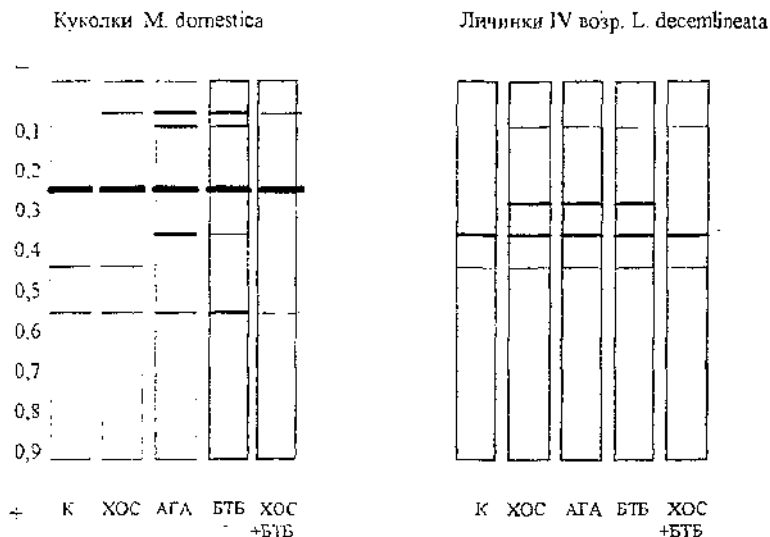


Рисунок 5. Индукция дополнительных молекулярных форм фенолоксидазы при действии БТБ и хитосахаридов на домашнюю муху и колорадского жука.

Глава 5. Биохимическая модель начальной стадии развития инфекционного процесса у медоносной пчелы при заражении БТБ. Детальное изучение биохимических аспектов адаптивного воздействия ХОС на медоносную пчелу требовало четкой модели развития инфекционного процесса. Для этих целей мы подробно проанализировали динамику биохимических процессов и физиологических изменений на начальной стадии (24 часа) развития инфекционного процесса у медоносной пчелы при заражении БТБ.

5.1. Биохимическая модель начальной стадии инфекционного процесса у медоносной пчелы. Ввиду отсутствия культуры специфичного для медоносной пчелы микроорганизма со стабильным уровнем патогенности для построения

модели мы использовали широко применяемый в практике защиты растений и хорошо изученный бактериальный препарат битоксибациллин.

Bacillus thuringiensis - спорообразующие грамположительные бактерии, обладающие способностью образовывать во время споруляции кристаллическое тело. После поглощения бактерией насекомыми, кристаллы растворяются в средней кишке. Полагают (Kushner, Heimpel, 1957), что α -экзотоксин битоксибациллина (фосфолипаза С) участвует в проникновении бактерии в хозяина, β -экзотоксин (Faust, 1974) ингибирует нуклеотидазы и ДНК-зависимые РНК-полимеразы, связанные с АТФ, из-за чего снижается синтез РНК (Hogstra, 1968), δ -эндотоксин высвобождается при распаде вегетативной клетки в ходе споруляции (Molgo, 1961), вызывая паралич кишечника. Через 50-55 минут после поглощения кристалла битоксибациллина могут возникнуть разрывы в кишечном эпителии хозяина, эпителиальные клетки отшелушиваются и обнажающаяся базальная мембрана становится доступной для нападения вегетативных бактериальных клеток. Развитие вегетативной клетки из споры в организме насекомого происходит в течение нескольких часов. Полный цикл развития бактерий, при наличии благоприятных условий, достигается через 28-48 часов после инокуляции (Dulmage, Rhodes, 1971).

Устойчивость насекомых к действию патогенных микроорганизмов обусловлена целым рядом неспецифических и специфических процессов. Степень устойчивости насекомых к инфекции в значительной степени зависит от скорости развития инфекционного процесса и уровня активности и реактивности защитных ферментативных систем.

В нашем эксперименте на начальной стадии инфекционного процесса при заражении БТБ отмечалось снижение активности каталазы (рис. 6). Подобная реакция отмечена у личинок капустной совки и других чешуекрылых (Батурина, 1978).

Снижение активности каталазы сопровождалось двумя всплесками активности пероксидазы (почти в 2,5 раза) через 1 и 10 часов с начала развития инфекционного процесса. Оба пика активности пероксидазы следовали непосредственно

после снижения активности каталазы. При сравнении графиков суточной динамики активности каталазы и уровня образования МДА можно отметить, что значения этих двух показателей находились в противофазе друг к другу. Высокий уровень активности фермента сопровождался низкими значениями МДА, при резком падении активности фермента от 3 до 4 часов уровень образования МДА увеличился в 2 раза. Снижение активности каталазы (значительно развитой антиперекисной системы защиты у пчел) на начальном этапе развития инфекционного процесса, вероятно, приводит к увеличению содержания перекисных соединений, что может быть причиной всплесков активности пероксидазы. Таким образом, стабилизация процессов образования вторичных продуктов перекисного окисления липидов (МДА) у пчел осуществляется за счет сбалансированного взаимодействия

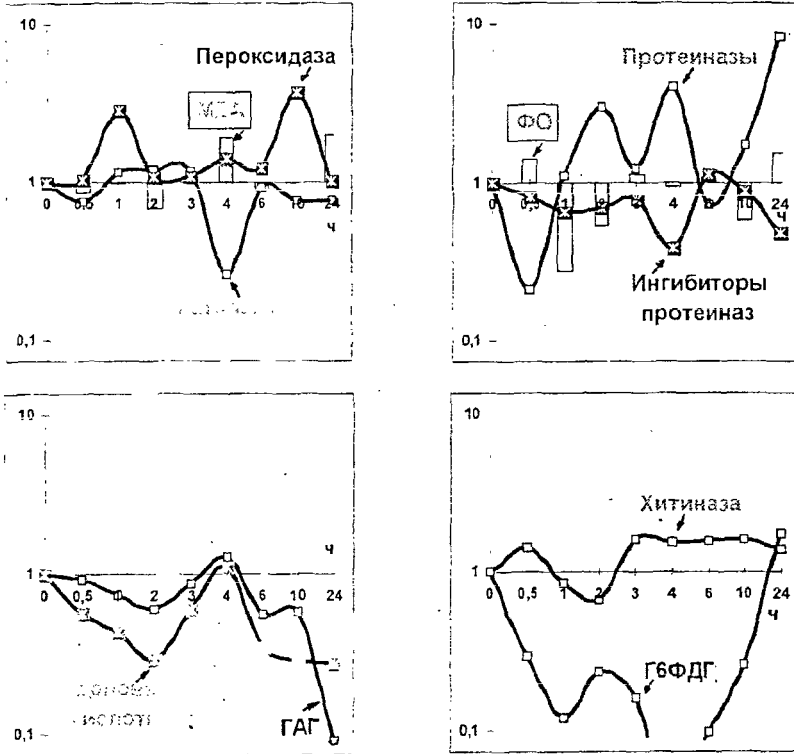


Рисунок 6. Биохимическая модель начальной стадии развития патогенеза у медоносной пчелы при заражении БТБ (биохимические показатели приведены относительно контроля).

систем антиперекисной защиты.

Изучение динамики активности ФО комплекса показало, что в течение первых 30 мин после введения пчелам БТБ активность ФО увеличивалась, что свидетельствует о высокой реактивности данной системы в ответ на заражение. После часового спада активности от 1 до 3 часов наблюдали возвращение к контрольному уровню, затем активность вновь понижалась, а к концу суток возрастала. Подобные тенденции в динамике суточной активности ФО комплекса наблюдали на хлопковой совке при заражении различными патогенами (Глулов, 1993). Протеазная и ингибиторная активности также находились в противофазе друг к другу. При резком повышении ингибиторной (ИП) активности к 6 часам отмечалось снижение протеазной. Ранее снижение активности протеиназ и других ферментов было отмечено у представителей отряда чешуекрылых при применении бакпрепаратов (Батурин, Батурина, 1978, Глулов, 1993). К концу первых суток активность ингибиторов снижалась почти до нуля, в то время как протеазная возрастала в 6 раз, при этом увеличивалась и активность ФО.

В первые 2 часа после заражения БТБ наблюдалось уменьшение количества ГАГ и уроновых кислот, в последующие 2 часа отмечался их значительный прирост, с последующим снижением после 4 часов. По-видимому, это связано с изменением активности гликоконъюгационных и/или репаративных процессов. Ранее такие процессы были описаны на крысах (Тиунов, 1987).

При заражении пчел бактериальным препаратом первый пик активности хитиназы (в 1,5 раза выше уровня контроля) регистрировался уже через 30 минут, последующий устойчивый рост активности отмечался после 2 часов.

Активность Г6ФДГ в течение первых 4 часов устойчиво снижалась. Начиная с 10 часов активность начинала увеличиваться, достигая пика (в 1,7 раза выше контрольного уровня) к 24 часам, затем постепенно снижалась к контрольному уровню. Наблюдаемое падение активности, вероятно, связано с повышением значимости основного гликолитического пути (Эмбдена-Мейергофа) для решения энергетических проблем, связанных с развитием инфекционного процесса.

5.2. Сравнительное действие препарата БТБ и культуры бактерий *Vaccillus thurengiensis* на физиолого-биохимические показатели медоносной пчелы. Для того, чтобы выяснить чем были вызваны наблюдаемые изменения на начальном этапе инфекционного процесса, только кристаллами токсина, содержащимися в препарате и/или спорами бактерий, одним пчелам давали с сиропом бактериальный препарат, другим - выделенный из него возбудитель. Микробиологический контроль накопления бацилл в кишечнике проводили через 0,5; 2; 6 и 24 часа от начала заражения путем посева содержимого средней кишки на питательную среду. Также регистрировали скорость освобождения кишечника от патогена, после прекращения поступления его в кишечник через 1; 5; 7 суток. Одновременно отмечали состояние кишечника и величину рН пищеварительного тракта. К концу первых суток развития инфекционного процесса утолщалась и разрыхлялась перитрофическая мембрана средней кишки, к концу вторых суток наблюдалось истончение стенок кишечника и появление небольших изъязвлений, происходило легкое зашелачивание содержимого. Погибшие пчелы обладали всеми признаками развившейся септицемии. При сопоставлении роста числа колоний, высеванных из средней кишки, в зависимости от продолжительности питания сиропом, содержащим бактерии, с патологическими нарушениями в кишечнике очевидным становится то, что тяжесть функциональных нарушений зависит не только от вирулентности патогена, но и от количества поступления его в организм. Функциональные нарушения в кишечнике пчел, вызванных БТБ и выделенным из него возбудителем, а также динамика изменений биохимических показателей позволяет отметить значительное их сходство. Однако в варианте с БТБ эти изменения наступали несколько раньше и наблюдали некоторое снижение уровня активности биохимических показателей, вероятно, из-за наличия в препарате токсина. Таким образом, видно, что наблюдаемые физиолого-биохимические изменения на начальном этапе инфекционного процесса объясняются наличием прежде всего одного возбудителя. На основании полученных результатов была предложена схема развития инфекционного процесса у медоносной пчелы (табл. 2).

Таблица 2.

Схема развития инфекционного процесса у мелодной пчелы при заражении БТБ.

	0ч		1ч		4ч		6ч		24ч		48ч	
Состояние патогена	Попадание спор в полость кишечника		Начало прорастания спор		Завершение образования вегетативных клеток, начало выделения токсинов		Наращение количества клеток патогена. Увеличение количества выделяемых токсинов					
pH кишечника	pH слабo-кислая		pH нейтральная		pH слабo-щелочная		pH слабo-щелочная		pH слабo-щелочная		pH слабo-щелочная	
Состояние кишечника	Кишечник без видимых изменений				Средняя кишка разбухает, перитрофическая мембрана разрывается, содержит темнеет		Истончение стенок средней кишки, уменьшение объема толстой кишки		Появление изъязвленной стенки средней кишки, размер толстой кишки уменьшается в 2 раза		Разрыв стенок средней кишки, развитие септицемии	
Состояние биохимических показателей	ФО хитиназа	Λ	протеазы	Λ	хитиназа	+	хитиназа	+	ФО	+	ФО	+
	каталаза)	МДА)	каталаза)	протеазы)	МДА)	МДА)
	пероксидаз)	ГАГ)	ИП)	Г6ФДГ)	ИП)	ИП)
	Г6ФДГ)	хитиназа)	Г6ФДГ)	МДА)	протеазы)	протеазы)
	протеазы)	пероксид	=	пероксид	=	ФО	=	Г6ФДГ)	Г6ФДГ)
	ИП)	ФО)	ФО	=	пероксид)	ГАГ)	ГАГ)
	ГАГ)	Г6ФДГ)	протеазы)	ИП)	хитиназа)	хитиназа)
	МДА)	каталаза)	МДА)	ГАГ)	каталаза)	каталаза)
					ГАГ)	каталаза	→	пероксид)	пероксид)
Периоды инфекционного процесса	Период неспецифической реакции		Латентный период		Начало регистрации патологических изменений		Наращение патологических изменений		Острое течение болезни		Период, определяющий исход болезни	
О.Ф. Гробов, 1989	Инкубационный период				Предклинический период				Клинический период			
	0ч		1ч		4ч		6ч		24ч		48ч	

Примечание: Λ - пик активности, + - устойчиво высокая активность,) - рост активности, = - активность на уровне контроля,) - спад активности, → - устойчиво низкая активность.

5.3. Сравнение суточной динамики биохимических показателей у пчелы при заражении БТБ и при действии ХОС. При добавлении в корм ХОС отмечалась тенденция к устойчивому повышению активности каталазы в течение первой половины суток и постепенная стабилизация активности до уровня контроля к концу суток. Профиль суточной активности пероксидазы при действии ХОС и БТБ был похожим, но уровень активности в первом случае был ниже. Профиль динамики МДА также имел сходный характер, но с опережающей амплитудой колебаний в варианте с ХОС (рис. 7).

Аналогичная опережающая амплитуда всплесков активности протеиназ сопровождалась резким снижением ингибиторной активности. Результирующая активности ФО системы несколько снижалась, но была более стабильной, без резких спадов и подъемов, наблюдаемых при бактериальной инфекции.

Содержание ГАГ и урановых кислот при действии ХОС было незначительно выше уровня, наблюдавшегося при бактериальной инфекции, но к завершению суток сильно возрастала. При развитии же инфекционного процесса происходит их значительное снижение. Подобного рода процессы наблюдали при действии на теплокровных экзогенными ГАГ в лечебном режиме, отмечая при этом общий положительный эффект (Банкатов, 1997).

Активность Г6ФДГ колебалась в пределах контрольного уровня с небольшим всплеском активности в промежутке от 4 до 10 часов.

Подводя итог, можно отметить, что на начальной стадии заражения медоносной пчелы битоксибациллинном происходила активация фенолоксидазного каскада, ингибирование антиокислительных процессов, накопление вторичных продуктов перекисного окисления, угнетение пентозофосфатного пути. Снижение уровня активности большинства наблюдаемых процессов при развитии патогенеза согласуется с теорией снижения уровня метаболических процессов при повреждении клеток (Мелехов, 1983). Действие ХОС носило в целом сходный характер, однако отмеченные отличия в активации одних процессов и стабилизации других могут отражать установленные ранее адаптивные свойства ХОС.

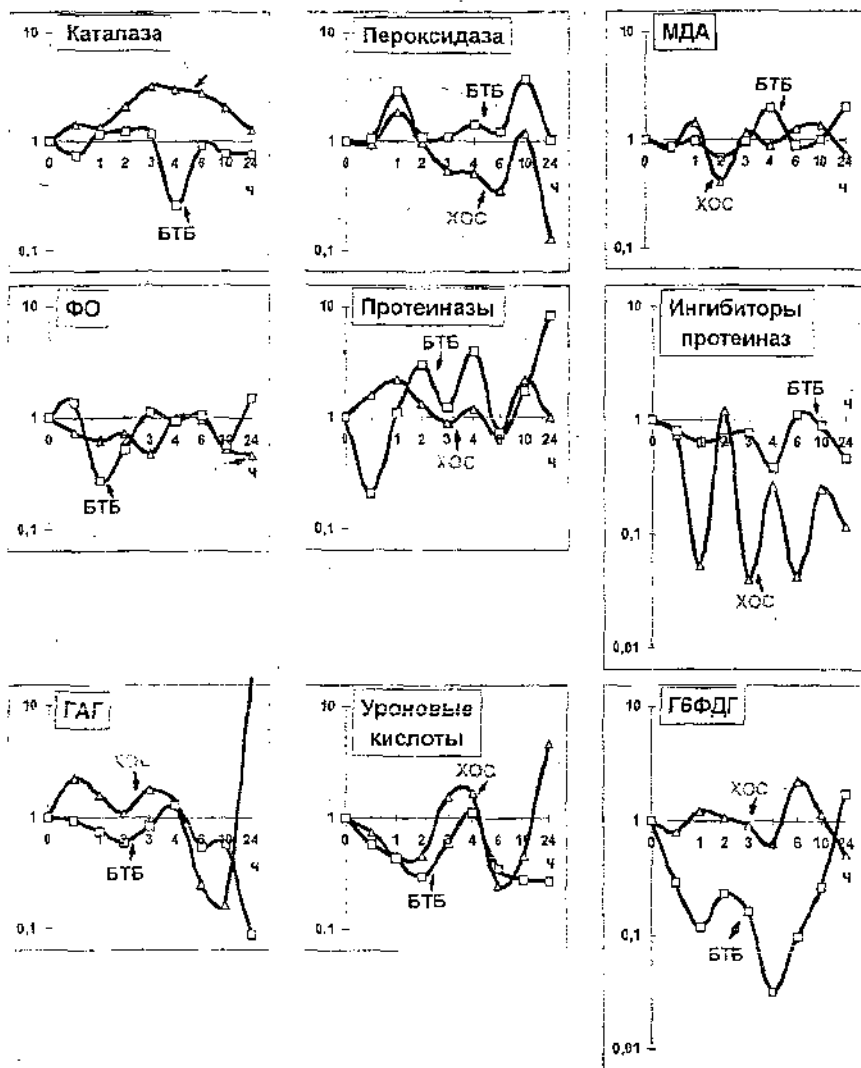


Рисунок 7. Сравнение динамики суточной активности биохимических показателей у медоносной пчелы при инфекционном процессе и при действии ХОС (биохимические показатели приведены относительно контроля)

Экспериментальные данные позволяют выделить несколько критически точек, в которых происходят значительные изменения в активности регистрируемых процессов, через 1, 4, 10 и 24 часа после начала заражения БТЕ. Наблюдения

мые физиолого-биохимические изменения позволяют выделить несколько периодов патологического процесса: период неспецифической реакции (до 1ч.); латентный период (1-4 часа); начало регистрации патологических изменений (4-6 часов); нарастание патологических изменений (6-24 часов); острое течение болезни (24-48 часов) и период определяющий исход болезни.

Глава 6. Преадаптивное действие хитоолигосахаридов на развитие инфекционного процесса у медоносной пчелы. На основе построенной модели начальной стадии инфекционного процесса у медоносной пчелы изучали преадаптивное действие хитоолигосахаридов (длительность содержания на ХОС - 3, 5 и 7 суток). Биохимические показатели регистрировали для критических точек, выявленных в предыдущем эксперименте (табл.3).

При 3-х суточном содержании пчел на ХОС с последующим заражением БТБ происходило снижение количества МДА на фоне активации антиоксидентных ферментов (рис. 8). Количество уроновых кислот к концу первых суток уменьшалось в 4 раза, количество ГАГ в течение суток примерно во столько же повышалось. Активность ФО комплекса к концу 1-х суток возрастало почти в 1,5 раза. Пик активности протеиназ (в 2 раза выше контроля) приходился на 4 часа, при этом наблюдался спад активности ингибиторов почти до нулевого уровня. Максимальная ингибиторная активность (в 23 раза выше контроля) регистрируется к 9 часам вместе с минимальной активностью протеиназ и ФО системы. В течение суток происходило снижение активности Г6ФДГ с последующим восстановлением почти до контрольного уровня.

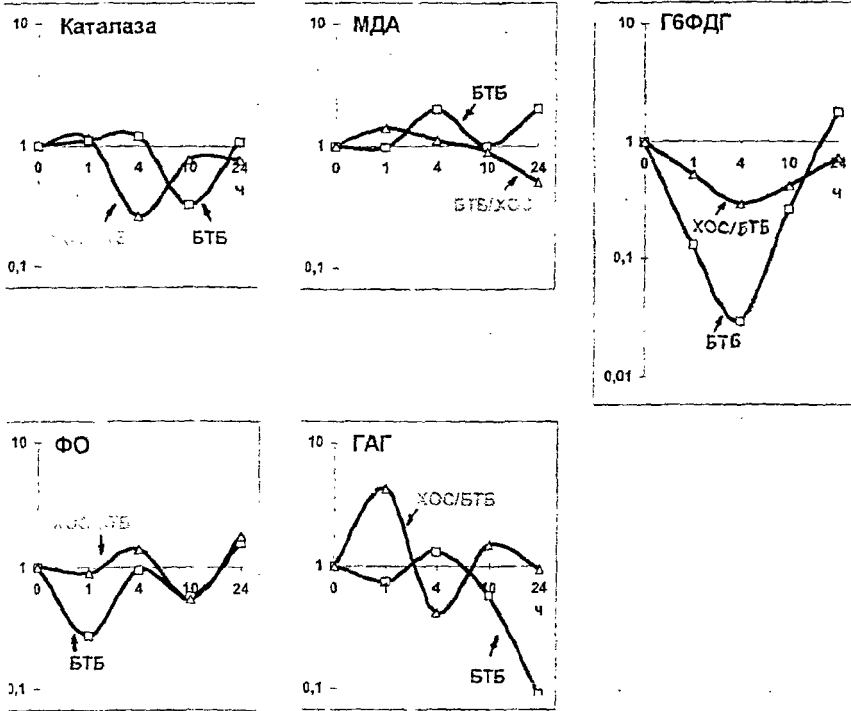
При содержании пчел на ХОС в течение 5-ти и 7-ми суток с последующим заражением БТБ отмечалось определенное сходство с вышеописанным экспериментом в динамике наблюдаемых процессов, заметно, однако, некоторое смещение фаз развития одних процессов вправо по оси абсцисс (уроновых кислот и ингибиторов протеиназ), других влево (ФО, протеиназы, хитиназа). При этом сохраняется профиль динамики активности этих процессов, наблюдаемый в варианте

Таблица 3.

Активность ферментов при заражении пчел БГБ на фоне предварительной подкормки ХОС в течение различных периодов времени (биохимические показатели приведены по отношению к контролю)

Вариант	ГбФДГ	Каталаза	Пероксидаза	Хитиназа	МДА	ФО	Протеиназы	Ингибиторы протеиназ	ГАГ	Уровневые кислоты
Единицы измерений в эксперименте	мМ/мин/мг белка	мМ/мин/мг белка	ед.ак./мг белка	мг/мг белка	мг/г ткани	ед.ак./мг белка	ед.ак./мг белка	ед.ак./мг белка	мг/г ткани	мг/г ткани
подкормка ХОС 3 суток										
1ч	0,52	1,07	0,64	2,19	1,36	0,97	0,48	0,02	4,46	1,01
4ч	0,29	1,17	0,98	4,25	1,09	1,47	2,33	0,04	0,45	0,35
10ч	0,42	0,32	0,95	4,41	0,86	0,57	0,48	24,70	1,50	1,18
24ч	0,74	0,06	1,14	1,67	0,49	1,83	1,04	16,53	0,85	0,21
подкормка ХОС 5 суток										
1ч	0,83	0,48	2,43	0,57	1,19	1,00	1,08	0,20	1,44	1,26
4ч	0,11	1,21	2,46	0,43	0,81	0,44	0,85	94,00	0,79	0,94
10ч	0,61	1,19	3,86	2,43	0,93	0,61	1,00	108,73	0,96	0,43
24ч	0,83	1,10	1,46	7,93	1,26	0,88	0,62	15,06	1,24	1,59
подкормка ХОС 7 суток										
1ч	0,20	0,96	1,04	1,21	0,42	1,58	0,40	350,70	0,54	0,68
4ч	4,43	1,06	1,42	0,34	0,43	0,40	0,36	297,60	0,28	0,54
10ч	2,21	0,90	1,49	0,05	0,57	0,50	0,78	1410,70	0,26	0,22
24ч	4,46	0,33	0,46	0,61	0,36	1,05	0,27	917,60	0,54	0,48

(в светлых клетках различие опыта с контролем достоверно, $p > 0,95$)



рисунк 8. Преадаптивное действие ХОС на медоносную пчелу при заражении пчел БТБ подкормка 3 суток) (биохимические показатели приведены относительно контроля).

ри заражении БТБ без предварительной подкормки. Предварительная подкормка чел ХОС сопровождалась заметными различиями в развитии инфекционного роцесса: разбухание перитрофической мембраны в ответ на действие патогена роисходило только спустя 4 часа после заражения, длительное время не изменя- ось рН кишечника, а спустя 48 часов не происходили патологические изменения кишечника, приводящие к развитию септицемии.

Микробиологический контроль за накоплением бактерий в кишечнике и скоростью очищения его от патогена после прекращения поступления бактерий в пищеварительный тракт, позволяют сделать вывод о том, что у пчел получавших инее ХОС очищение кишечника происходило значительно быстрее (рис. 9). Уже и шестые сутки кишечник полностью очищался от *Bacillus thuringiensis*, в то вре- я как у контрольных наблюдался рост колоний и на 7-е, и на 9-е сутки.

Время с момента
введения БТБ пчелам

Концентрация
посева на агар

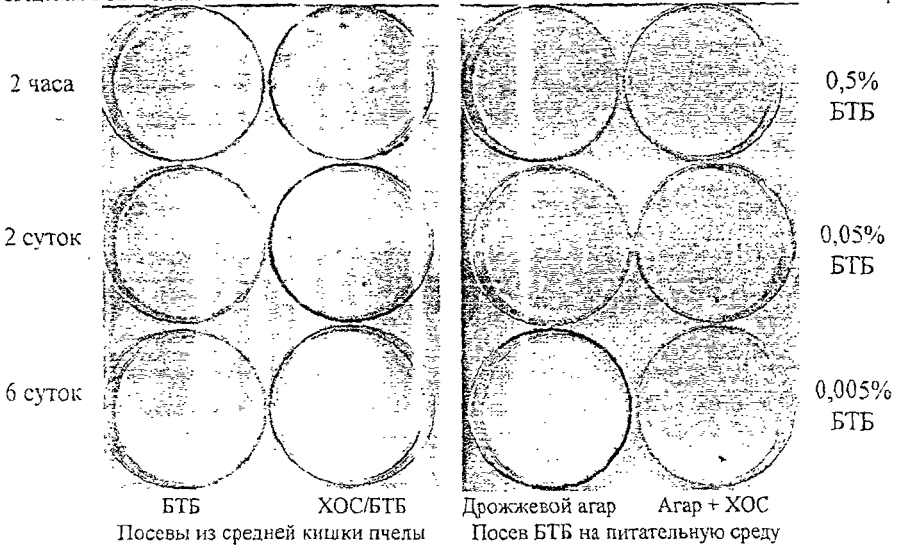


Рисунок 9. Предварительное содержание пчел на корме с добавкой хитоолигосахаридов ускорило освобождение средней кишки насекомого от клеток патогена *Bacillus thuringiensis*

Рисунок 10. Добавление хитоолигосахаридов в культуральную среду не задерживало развитие *Bacillus thuringiensis* на агаре.

Добавление ХОС непосредственно в культуральную среду не уменьшало количество колоний бактерий, прораставших на дрожжевом агаре (рис.10). Таким образом можно предположить, что ХОС влияют определенным образом на иммунный статус насекомого, способствуя положительному исходу болезни. Эффективность действия ХОС зависит от продолжительности подкормки пчел. Достаточным сроком подкормки с точки зрения биохимических процессов и общей реакции организма можно считать трое суток.

Нами было показано преадаптивное действие хитоолигосахаридов на медоносную пчелу, сопровождающееся изменением реактивности ферментативных систем. Общность этих изменений говорит о влиянии хитоолигосахаридов на регуляцию скорости неспецифического ответа на бактериальную инфекцию. Таким образом, хитоолигосахариды при действии на медоносную пчелу формируют та

называемый структурный след адаптации (Меерсон, 1983), изменяя уровень метаболических процессов для более быстрой реализации защитных реакций при инфекционном процессе.

Полученные результаты позволяют выдвинуть гипотезу о том, что *эндогенные* олигомеры хитина могут выступать в качестве сигнальных молекул (регуляторов) неспецифических систем защиты насекомых и их метаболизма в целом.

Выводы.

1. Впервые показано, что хитин, хитоолигосахариды и N-ацетил-D-глюкозамин обладают биологической активностью по отношению к организму насекомых. При этом характер действия хитосахаридов зависит от размера молекулы и вида насекомого.
2. Сравнительный анализ действия хитина, хитоолигосахаридов и N-ацетил-D-глюкозамина на медоносную пчелу показал, что максимальным преадаптивным эффектом при гипо- и гипертермии, а также при инфекционном процессе обладают хитоолигосахариды.
3. Для детального изучения действия хитоолигосахаридов на устойчивость пчелы к патогенам нами была разработана модель развития инфекционного процесса при заражении БТБ и выделены его временные периоды: период неспецифической реакции (до 1ч.), латентный период (1-4 часа), начало регистрации патологических изменений (4-6 часов), нарастание патологических изменений (6-24 часов), острое течение болезни (24-48 часов) и последующий период, определяющий исход болезни.
4. Выявлено, что на начальной стадии заражения пчелы БТБ происходит активация фенолоксидазного каскада, ингибирование антиокислительных процессов, накопление вторичных продуктов перекисного окисления липидов, угнетение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.
5. Хитоолигосахариды вызывают сходный характер изменений перечисленных биохимических показателей метаболизма пчелы, при этом наблюдаются неко-

торые отличия в активации одних процессов и стабилизации других, что, вероятно, способствует оптимизации иммунного ответа.

6. Хитоолигосахариды влияют на иммунный статус пчелы, способствуя быстрому очищению организма от болезнетворных бактерий в кишечнике и восстановлению жизненно важных функций. Характер действия хитоолигосахаридов на гуморальные факторы иммунитета пчелы позволяет предположить, что они имитируют компоненты клеточных стенок *Bacillus thuringiensis*. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о появлении под влиянием хитоолигосахаридов и N-ацетил-D-глюкозамина новых молекулярных форм фенолоксидаз, идентичных формам, индуцируемым при заражении насекомых БТБ.
7. Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что хитоолигосахариды в организме медоносной пчелы индуцируют целый спектр изменений в ферментативной системе насекомого, который можно отнести к неспецифическим ответным реакциям, поскольку хитоолигосахариды повышают устойчивость пчелы не только к инфекции, но и к абиотическим стрессовым факторам. Таким образом хитоолигосахариды при действии на пчелу формируют «структурный след адаптации», способствующий быстрой реализации защитных механизмов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Салтыкова Е.С. Индукция неспецифических эстераз у комнатных мух перметрином // Изучение, охрана и рациональное использование природных ресурсов Уфа, 1989. С.78.
2. Поскряков А.В., Салтыкова Е.С. Ферменты детоксикации инсектицидов в онтогенезе колорадского жука // Изучение и рациональное использование природных ресурсов. Уфа, 1991. С.25.
3. Поскряков А.В., Салтыкова Е.С., Амирханов Д.В. Активность ферментов детоксикации в онтогенезе колорадского жука // Современное положение с рези

- стентностью вредителей, возбудителей болезней растений и сорняков к пестицидам Уфа, 1992. С.31-33.
4. Поскряков А.В., Салтыкова Е.С., Амирханов Д.В. Активность инсектицидов и ферменты детоксикации в онтогенезе колорадского жука // *Агрохимия*. 1993. №9. С.94-100.
 5. Салтыкова Е.С., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Хайруллин Р.М. Повышение адаптивности медоносной пчелы при использовании хитоолигосахаридов // *Экологический императив сельского хозяйства Республики Башкортостан*. Уфа, 1998. С. 67-68.
 6. Saltykova E.S., Poskryakov A.V., Benkowskaya G.V., Khayrullin R.M., Nikolenko A.G. Adaptive effect of chitooligosaccharides on the honeybee *Apis mellifera mellifera* L. // *Biologically Active Polysaccharides*. Oslo, 1998.
 7. Saltykova E.S., Poskryakov A.V., Benkowskaya G.V., Nikolenko A.G. Chitooligosaccharides reduce a lipid peroxidation level in honeybee *Apis mellifera mellifera* L. tissues // *Biologically Active Polysaccharides*. Oslo, 1998.
 8. Benkowskaya G.V., Saltykova E.S., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Phenoloxidase system expression under the chitooligosaccharides action in insects // *3rd Carbohydrate Bioengineering Meeting*. England, 1999.
 9. Поскряков А.В., Салтыкова Е.С., Саттаров В.Н. Влияние хитоолигосахаридов на уровень перекисного окисления липидов при бактериальном заражении *Apis mellifera mellifera* // *Актуальные проблемы современной биохимии и биотехнологии*. Челябинск, 1999.
 10. Салтыкова Е.С., Беньковская Г.В., Поскряков А.В. Индукция хитоолигосахаридами системы фенолоксидаз у насекомых // *Актуальные проблемы современной биохимии и биотехнологии*. Челябинск, 1999.
 11. Салтыкова Е.С., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Хайруллин Р.М. Иммуномодулирующее действие хитоолигосахаридов на медоносную пчелу *Apis mellifera* // *Эволюционная биохимия и физиология*. 1999 (принято в печать).