

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ СИСТЕМАТИКИ И ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ**

На правах рукописи

ДУБОВСКИЙ Иван Михайлович

**АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА КИШЕЧНИКА ЛИЧИНОК
GALLERIA MELLONELLA L. ПРИ БАКТЕРИОЗЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ**

03. 00. 09 – энтомология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**



Новосибирск – 2004

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
В.В. Глушов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
М.В. Штерншис

кандидат биологических наук
А.А. Алексеев

Ведущее учреждение: Томский государственный
университет

Защита состоится “ 8 ” февраля 2005 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 в Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11

Отзывы на автореферат диссертации в двух экземплярах, заверенные печатью учреждения, просим направлять по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11, Диссертационный совет ИСиЭЖ СО РАН. Факс: (3832) 170973, e-mail: mi@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН

Автореферат разослан “ ” декабря 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



А.Ю. Харитонов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

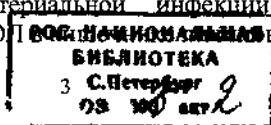
Актуальность исследования. В окружающей среде существует большое количество бактерий способных поражать насекомых. При развитии бактериальной инфекции происходит взаимодействие метаболитов бактерий и защитных систем насекомых. При этом особое значение играет состав кормового субстрата, компоненты которого могут оказывать влияние как на организм насекомого, в частности на функционирование защитных механизмов, так и на активность метаболитов энтомопатогенных бактерий.

Известно, что действие δ -эндотоксина и других метаболитов бактерий *Bacillus thuringiensis* (БТ) на эпителиальные клетки кишечника сопряжено с нарушением целостности и функциональной активности клеточных мембран, что может приводить к неконтролируемому усилению радикальных окислительных процессов за счет развития реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) и нарушения окислительного фосфорилирования [Travers et al., 1976; Harvey et al., 1983; Voctor, Salama, 1983; Knowles, Ellar, 1987; Штерншис, 1995]. Вторичные метаболиты (ВМ) растений могут оказывать токсическое воздействие на насекомых, связываясь с эпителиальными клетками кишечника, а также за счет проявления прооксидантных свойств. В частности, известно, что окисление фенолов до хинонов в кишечнике может инициировать образование активированных кислородных метаболитов различных животных [Appel, Martin, 1990; Summers, Felton, 1994; Appel, 1994, Zenkov и др., 2001]. Последние за счет своей высокой реакционной способности могут существенно влиять на функционирование эпителиальных клеток и, как следствие, на весь организм насекомого. Не исключено, что описанные нарушения под действием ВМ растений могут значительно изменять течение бактериальной инфекции. Контроль над активностью радикальных окислительных процессов в организме животных, в том числе и насекомых, осуществляет, антиоксидантная система [Felton, Summers, 1995; Янковский, 2000]. Существуют единичные работы по изучению влияния инфекций, вызванных энтомопатогенными грибами, вирусами и микроспоридиями на процессы генерации АКМ и активность антиоксидантной системы в организме насекомых [Серебров, 2000; Wang et al., 2001; Лозинская и др., 2003]. К сожалению, работы по изучению антиоксидантной системы насекомых при бактериозе встречаются редко. Работы, посвященные изучению влияния ВМ растений и других ксенобиотиков на организм насекомых также немногочисленны [Peric-Mataruga et al., 1997; Jonson, Felton, 2001; Barbehenn et al., 2001; Barbehenn et al., 2003].

Цель исследования. Изучение влияния бактериоза и вторичных метаболитов растений на антиоксидантную систему кишечника насекомых на примере личинок большой вощиной огневки *Galleria mellonella* L.

Задачи исследования.

1. Изучить влияние бактериальной инфекции *B. thuringiensis* на активность процессов ПОЛ в личинках *G. mellonella*;



2. Исследовать влияние бактериальной инфекции *B. thuringiensis* на активность ферментативных и неферментативных антиоксидантов в кишечнике личинок *G. mellonella*;
3. Изучить влияние экстрактов растений, подавляющих развитие личинок *G. mellonella*, на активность процессов ПОЛ в кишечнике;
4. Исследовать влияние экстрактов растений, подавляющих развитие личинок *G. mellonella*, на активность ферментативных и неферментативных антиоксидантов.

Научная новизна. Впервые изучено изменение активности антиоксидантов – супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы и концентрации тиол-содержащих веществ при развитии бактериальной инфекции *B. thuringiensis*. Впервые установлено, что скормливание экстрактов растений, подавляющих развитие личинок *G. mellonella*, приводит к снижению активности процессов ПОЛ на фоне повышения окисления тиол-содержащих веществ. Установлено, что развитие бактериоза, а так же воздействие экстрактов ряда растений подавляющих развитие насекомых сопровождается изменением баланса “оксиданты-антиоксиданты” в кишечнике личинок *G. mellonella*, при этом ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы могут выступать одним из защитных механизмов предотвращающих разрушающее действие высокорекреационных радикалов.

Практическая значимость. Результаты, полученные в ходе исследований, позволяют оценить активность радикальных окислительных процессов и защитную роль антиоксидантной системы насекомых при бактериозе и воздействии аллелохимиков растений. Данные результаты могут служить основой для поиска веществ, в частности ВМ растений, нарушающих баланс “оксиданты-антиоксиданты” у насекомых, что можно использовать для совершенствования биопрепаратов на основе БТ, применяемых для регуляции численности фитофагов.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Всероссийской конференции “Беспозвоночные животные Южного Зауралья и сопредельных территории” (Курган, март 1998), на конференции “Паразиты в природных комплексах и рисковые ситуации” (Новосибирск, июнь 1998), на VI Европейском энтомологическом конгрессе (Чехия, август 1998), на Международном симпозиуме “Сохранение и защита горных лесов” (Ош, октябрь 1999), на XII съезде Русского Энтомологического общества (Санкт-Петербург, август 2002), на VII Европейском энтомологическом конгрессе (Греция, октябрь 2002), на отчетных сессиях ИСиЭЖ СО РАН (апрель 2002), на заседаниях микробиологического общества (ноябрь 2004).

По материалам диссертации опубликовано 16 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста; состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 2 таблицами. Список литературы включает 300 работ, из них 254 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. В.В. Глупову за руководство научной работой, к.б.н. Л.И. Бурцевой за представленные штаммы *Bacillus thuringiensis*, к.х.н. М.П. Половинке (ИОХ СО РАН, Новосибирск) за предоставление экстрактов растений и последующую их очистку и разделение, О.А. Олиференко, Е.А. Боярищевой, Е.В. Гризановой (ИСиЭЖ СО РАН) за помощь в проведении исследований, к.х.н. И.А. Слепневой, Д.Н. Комарову (ИХКиГ СО РАН, Новосибирск) за помощь в выполнении работ, связанных с ЭПР-спектроскопией, к.б.н. Я.Л. Воронцовой, к.б.н. С.А. Бахвалову, В.В. Мартемьянову (ИСиЭЖ СО РАН) за обсуждение рукописи и ценные критические замечания.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснованы выбор темы и ее актуальность, дана общая характеристика работы, сформулированы цель и задачи исследования.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В главе рассмотрены особенности течения бактериозов у насекомых. Проанализированы работы о взаимоотношениях в системе “растение – насекомое”. Обобщены функции антиоксидантной системы насекомых и роли её ферментативных и неферментативных компонентов при различных патогенезах и воздействии ксенобиотиков. Обоснована необходимость изучения антиоксидантной системы при бактериозе и воздействии вторичных метаболитов растений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследований служили личинки большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) 5-6 возрастов из лабораторной популяции. **Пероральное заражение** *G. mellonella* проводили при содержании личинок на питательной среде, в состав которой была добавлена спорокристаллическая суспензия *Bacillus thuringiensis ssp galleriae* в дозе 1×10^8 спор/мл на три грамма среды.

Экстракты растений получены с помощью стандартных методов из ряда растений, распространенных на территории Западной Сибири, обладающих антагонистическими свойствами по отношению к насекомым [Крылов, 1972; Минаева, 1991; Kuusik et al., 1995; Kaitaniemi et al., 1998; Cocchiello et al., 2002]. Для изучения влияния экстрактов растений на насекомых использовали 0,1% концентрации веществ на 1 г корма.

Для приготовления гомогенатов кишечника насекомых препарировали в 10 мМ фосфатном буфере pH 7.2 с 150 мМ NaCl (ФБ). Извлеченные органы растирали в стеклянном гомогенизаторе с холодным ФБ в соотношении 0,1 г на 1 мл буфера. Затем гомогенаты центрифугировали при 4°C в течение 15 мин

при 10000 g. Полученный супернатант использовали для спектрофотометрического определения активности ферментов, концентрации тиолов и малонового диальдегида.

Активность супероксиддисмутазы определяли при 560 нм по подавлению скорости восстановления нитросинего тетразолия супероксид-анионом, образующимся в процессе окисления ксантина ксантиноксидазой [McCord, Fridovich, 1969]. Активность каталазы определяли при 240 нм по скорости разложения H_2O_2 [Wang et al., 2001]. Активность глутатион-S-трансферазы (ГТ) определяли при 340 нм по скорости увеличения концентрации 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, продукта реакции 1-хлор-2,4-динитробензола и восстановленного глутатиона, катализируемой ГТ [Habig et al., 1974]. Определение активности эстераз в гомогенатах кишечника проводили по К. Асперену [Asperen, 1962] с незначительными изменениями. Удельную активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси при используемой для измерения длине волны в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка при температуре 28°C. Для определения концентрации восстановленных (RSH) и окисленных (RSSR) тиолов использовали спектрофотометрический метод, основанный на окислении RSH 2-нитро 5-тиобензойной кислотой [Khrantsov et al., 1997; Khrantsov et al., 1989]. RSSR предварительно разрушали до RSH 1N соляной кислотой. Концентрацию RSH и RSSR определяли согласно калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали восстановленный глутатион. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах кишечника определяли с помощью колориметрического метода определения МДА в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [Карган и др., 1986]. Концентрацию белка в гомогенатах кишечника определяли по методу Бредфорда [Bradford, 1986]. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку. Для проверки нормальности распределения данных использовали W критерий Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента [Доспехов, 1985].

ГЛАВА 3. Активность антиоксидантной системы личинок *G. mellonella* при бактериозе

3.1. Бактериоз личинок большой пчелиной огневки *G. mellonella*, вызываемый *Bacillus thuringiensis*

Бактерии *Bacillus thuringiensis* хорошо известны благодаря их патогенности по отношению к насекомым различных отрядов [Simpson et al., 1997; Rausell et al., 2000; Zhong et al., 2000]. При питании личинок *G. mellonella* 5-6 возрастов на корме, содержащем спорокристаллическую смесь БТ штамм 69-6, обнаружено достоверное ($p < 0,01$) отставание в весе зараженных

насекомых по сравнению с контрольными в 1,2 – 1,5 раза в течение всего опыта. Личинки были малоподвижны. В течение трехдневного эксперимента максимальная гибель отмечалась на первые сутки и составляла $30 \pm 2,1\%$, в последующие дни гибель снижалась до $15 \pm 2,5\%$ и $0,6 \pm 0,6\%$, соответственно. В контрольных вариантах гибель отсутствовала.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что бактерии БТ штамма 69-6 обладают ярко выраженной энтомопатогенной активностью. Наиболее острым периодом развития бактериальной инфекции являются первые сутки. Вероятно, столь быстрый эффект, а также высокая смертность, связаны с деятельностью кристаллического белкового эндотоксина, который является основным фактором инсектицидного действия БТ [Obukowitz et al., 1986; Lampel et al., 1994]. Эндотоксин, который образуется после активации протеазами, воздействует на клетки эпителия средней кишки зараженных личинок, при этом происходят патологические изменения клеточных органелл, в том числе нарушение проницаемости мембраны клеток, что, в конечном счете, приводит к осмотическому лизису клеток [Rausell et al., 2000; Gill et al., 1992]. Следует отметить, что важную роль в структурной организации мембран играет ПОЛ, поэтому всякого рода повреждения клеточной мембраны неизбежно сопровождаются активацией ПОЛ [Зенков и др., 2001].

3.2. Изменение концентрации малонового диальдегида при бактериозе личинок *G. mellonella*

Согласно полученным нами данным, в первые сутки после скармливания БТ личинкам *G. mellonella* отмечено достоверное ($p < 0,01$) увеличение концентрации МДА в кишечнике по сравнению с контролем (Рис. 1).

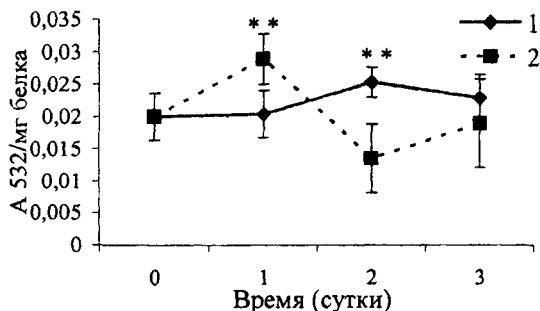


Рис. 1 Концентрация МДА в кишечнике нативных (1) и зараженных бактериями БТ штамм 69-6 (2) личинок *G. mellonella* ($n=10$; ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем)

Вероятно, увеличение концентрации МДА является следствием усиления процессов ПОЛ. Аналогичные результаты были получены при заражении личинок *G. mellonella*, капустной белянки *Pieris brassicae* и хлопковой совки *Spodoptera littoralis* бактериями БТ [Востор, Salama, 1983; Штерншис, 1995].

Возможно, действие активированного δ -эндотоксина на клетки эпителия кишечника может приводить к усилению реакции ПОЛ. Неконтролируемое усиление радикальных окислительных процессов может вызвать разобщение

процессов окислительного фосфорилирования, нарушение ионного транспорта, образование литических пор в плазматической мембране и как следствие гибель клеток [Travers et al., 1976; Harvey et al., 1983; Knowles, Ellar, 1987].

На вторые сутки развития бактериоза концентрация МДА достоверно ($p < 0,01$) снижалась в 2 раза по сравнению с контрольными значениями, с последующей нормализацией до контрольного уровня на третьи сутки (Рис. 1) Не исключено, что данные изменения возможны за счет действия антиоксидантной системы, которая может играть значительную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в кишечнике при развитии бактериоза на фоне усиления реакции ПОЛ и индукции АКМ. Для подтверждения этого предположения было изучено изменение активности ферментативных антиоксидантов (СОД, Каталазы, ГТ), а также неферментативных (тиол-содержащие соединения) во время бактериоза.

3.3. Влияние бактериоза на активность антиоксидантов в кишечнике личинок *G. mellonella*

3.3.1. Активность супероксиддисмутазы и каталазы

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что при инфицировании личинок *G. mellonella* бактериями БТ происходит достоверное ($p < 0,05$; $p < 0,01$) увеличение активности СОД в течение всего опыта (Рис. 2).

Активность этого специализированного антиоксиданта зависит от концентрации в среде супероксидного анион-радикала, продукция которого может увеличиваться при нарушениях в цепи транспорта электронов митохондрий и микросом, сопутствующих развитию деструктивных процессов в клетках кишечника [Зенков и др., 2001]. СОД катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot -}$) в перекись водорода (H_2O_2) [Felton, Summers, 1995].

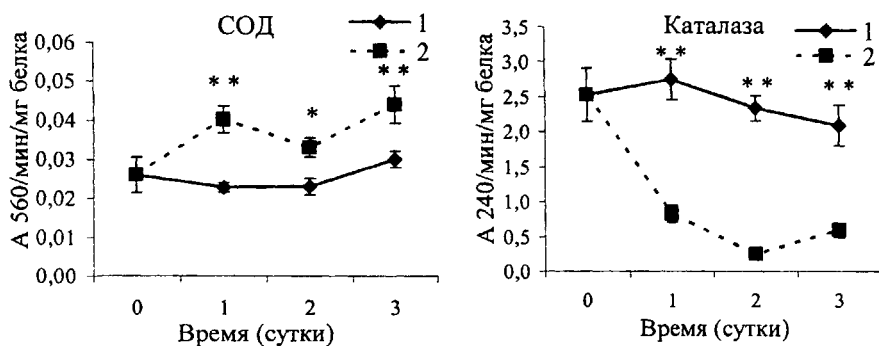


Рис. 2 Активность СОД и каталазы в кишечнике нативных (1) и зараженных бактериями БТ штамм 69-6 (2) личинок *G. mellonella* ($n=20$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем)

Известно, что СОД и каталаза преимущественно работают в комплексе, специализируясь на поэтапном восстановлении кислорода [Munday, Winterboume, 1989; Sies, 1991], поэтому мы предположили, что увеличение активности СОД приведет к наработке большего количества H_2O_2 , а, следовательно, и к повышению активности каталазы, специализирующейся на инактивации этого вещества. Однако, в наших экспериментах активность каталазы оказалась достоверно ($p < 0,01$) ниже контрольной в течении всего опыта (Рис.2). Сходные результаты были получены на личинках *Lymantria dispar*, питающихся на неблагоприятном для них растении [Peric-Mataruga et al., 1997]. Следует отметить, что в некоторых работах зарегистрировано ингибирование каталазы супероксид анионом [Kono, Fridovich, 1982; Pritsos et al., 1988]. Кроме того, в многочисленных исследованиях антиоксидантной системы животных обнаружено снижение активности этих ферментативных антиоксидантов при развитии так называемого окислительного стресса возникающего в результате патологических процессов [Wong et al., 1991; Pace et al., 1995; Akaike et al., 1998; Akaike et al., 2000; Wang et al., 2001; Barbehenn et al., 2001; Barbehenn, 2002].

Анализ литературных данных с учетом полученных нами результатов позволяет предположить, что СОД и каталаза играют активную роль в инактивации АКМ, образующихся при патологических нарушениях в клетках и тканях при бактериозе. Однако, восприимчивость каталазы, а в ряде случаев и СОД, к высоким концентрациям различных АКМ может нарушать функционирование этих ферментов при резких нарушениях окислительно-восстановительного гомеостаза, в том числе возникающих при острых бактериозах.

3.3.2. Активность глутатион-S-трансферазы

Активность ГТ в кишечнике личинок *G. mellonella* при заражении БТ достоверно увеличивалась ($p < 0,05$) на первые и третьи сутки в 1,3 раза по сравнению с контрольными значениями (Рис. 3).

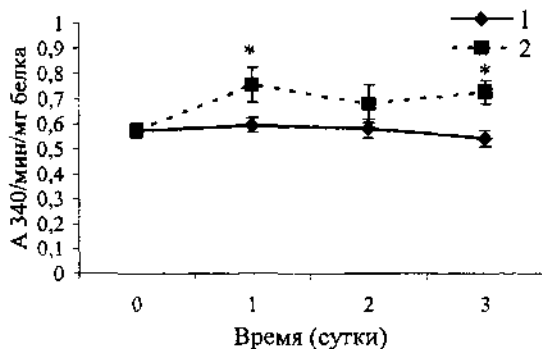


Рис. 3 Активность ГТ в кишечнике нативных (1) и зараженных бактериями БТ штамм 69-6 (2) личинок *G. mellonella* ($n=20$; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

Следует отметить, что увеличение активности ГТ в кишечнике личинок при развитии бактериоза наблюдалось на фоне увеличения концентрации МДА на первые сутки с последующим снижением на вторые и повышением до контрольных значений на третьи (Рис. 1). Увеличение активности ГТ на первые сутки после заражения личинок *G. mellonella* бактериями БТ на фоне накопления МДА может свидетельствовать об участии ГТ насекомых в детоксикации продуктов ПОЛ при развитии деструктивных процессов в кишечнике насекомых на первых этапах развития бактериоза. Участие ГТ в инаktivации токсичных продуктов также было отмечено при исследовании других патогенезов насекомых [Серебров, 2000; Лозинская и др., 2003].

3.3.3. Концентрация окисленных и восстановленных тиолов

В наших исследованиях мы оценивали изменение показателя $RSSR/RSH$ в кишечнике личинок *G. mellonella* после заражения бактериями БТ. При использовании данного показателя было зафиксировано достоверное ($p < 0,05$) увеличение отношения $RSSR/RSH$ у инфицированных насекомых на первые и на третьи сутки после заражения (Рис. 4).

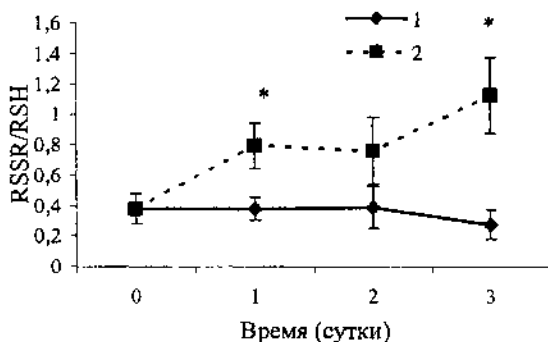


Рис. 4 Соотношение концентрации окисленных тиолов к восстановленным ($RSSR/RSH$) в кишечнике нативных (1) и зараженных бактериями БТ штамм 69-6 (2) личинок *G. mellonella* ($n=10$; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

Концентрация тиолов является одним из основных показателей для оценки окислительного стресса [Hirayama et al., 1989; Reuter, Klingler, 1992]. При различных стрессовых воздействиях и патологических состояниях наблюдается обратимая окислительная модификация SH-групп, приводящая к увеличению количества дисульфидных связей (окисленных тиолов – $RSSR$), что является неспецифической реакцией организма на различные экстремальные воздействия [Соколовский, 1988; Hirayama et al., 1989; Reuter, Klingler, 1992]. В ряде исследований выполненных как на позвоночных, так и на насекомых, для оценки активности радикальных окислительных процессов определяли соотношение окисленных тиолов к восстановленным [Rahman, Masnee, 2000; Wang et al., 2001]. Данный показатель использовали, потому что в радикальные окислительные процессы в первую очередь вовлекаются ненасыщенные липиды и SH-содержащие соединения. Соответственно окисление последних приводит к снижению содержания восстановленных

(RSH) и повышению уровня окисленных SH-групп, в результате повышается показатель RSSR/RSH.

Смещение баланса в сторону образования окисленных тиолов при развитии бактериоза может свидетельствовать о повышенной активности радикальных окислительных процессов. Увеличение окислительной модификации тиолов на фоне изменения концентрации МДА, увеличения активности СОД и ГТ на первые и третьи сутки после заражения насекомых свидетельствуют о повышении образования АКМ вследствие деструктивных процессов в кишечнике личинок под действием δ -эндотоксина и других метаболитов бактерий БТ.

ГЛАВА 4. Активность антиоксидантной системы личинок *G. mellonella* при антагонистическом воздействии вторичных метаболитов растений

4.1. Влияние экстрактов растений на структурные показатели популяции *G. mellonella*

Следует отметить, что наши исследования взаимоотношений в системе “растение – насекомое” проходили в рамках работы по поиску ВМ растений, обладающих негативным действием на насекомых. В связи с этим в первую очередь нас интересовал спектр растений, проявляющих антагонистические свойства к этим беспозвоночным. В качестве модельного объекта была выбрана большая пчелиная огневка *G. mellonella*, поскольку данный вид не адаптирован к питанию на растениях, содержащих повышенный уровень и разнообразный спектр различных ВМ, и поэтому является наиболее подходящим для изучения механизмов токсического действия ВМ.

Основываясь на данных литературы, был отобран ряд растений распространенных на территории Западной Сибири и обладающих антагонистическими свойствами по отношению к насекомым: пижма обыкновенная *Tanacetum vulgare*, багульник болотный *Ledum palustre*, олений мох *Cladonia uncialis*, мох сфагнум *Sphagnum*, болиголов пятнистый *Conium maculatum*, синяк обыкновенный *Echium vulgare*, живокость сетчатоплодная *Delphinium dictiocarpum*, льнянка обыкновенная *Linaria vulgare*, кубышка желтая *Nuphar luteum* [Крылов, 1972; Минаева, 1991; Kuusik et al., 1995; Cocchietto et al., 2002].

С помощью различных растворителей из них были получены полярные и неполярные экстракты, которые тестировали на способность вызывать гибель и снижать вес личинок *G. mellonella* 5-6 возрастов. После чего, были отобраны экстракты подавляющие развитие личинок: полярный экстракт пижмы, полярный и неполярный экстракты багульника и оленего мха, а также неполярная вытяжка мха сфагнума и усниновая кислота (выделенная из лишайника – оленего мха) (Рис. 5).



Рис. 5 Изменение веса личинок *G. mellonella* 5-6 возрастов на девятые сутки после скармливания экстрактов растений (n=60; *p<0,05 по сравнению с контролем)

Снижение веса насекомых при питании на корме с содержанием этих экстрактов свидетельствует о негативном влиянии ВМ, входящих в состав этих растений, на организм личинок *G. mellonella*. Следует отметить, что ВМ растений могут реализовывать свое негативное действие с помощью многочисленных механизмов [Шапиро и др., 1986]. Одним из распространенных эффектов является нарушение функционирования пищеварительной системы, посредством токсичного действия ВМ [Bernays, 1981; Steinly, Berenbaum, 1985]. При этом важную роль в инактивации продуктов, образующихся при деструкционных процессах в кишечнике, может играть антиоксидантная система [Peric-Mataruga et al., 1997; Barbehenn et al., 2001; Barbehenn et al., 2003]. В задачу наших исследований входило изучить влияние ВМ растений, подавляющих развитие насекомых на активность компонентов антиоксидантной системы личинок *G. mellonella*, и на уровень образования продуктов ПОЛ.

4.2. Изменение концентрации малонового диальдегида при воздействии вторичных метаболитов растений

При скармливании полярного экстракта пижмы, неполярного и полярного экстрактов багульника, а также неполярной вытяжки олевого мха и усниновой кислоты зафиксировано достоверное уменьшение концентрации МДА в кишечнике на 9 сутки эксперимента (Рис. 6).

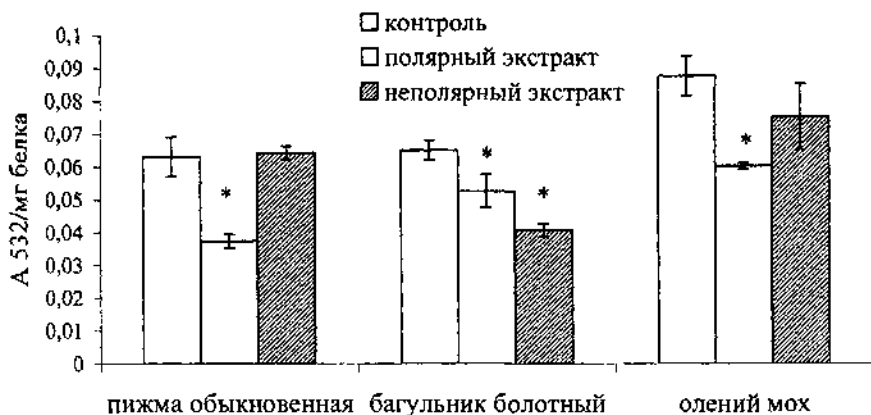


Рис. 6 Изменение концентрации малонового диальдегида в кишечнике личинок *G. mellonella* на девятые сутки после скармливания экстрактов растений (n=10; *p<0,05 по сравнению с контролем)

Снижение концентрации МДА в вариантах со скармливанием экстрактов растений может свидетельствовать о снижении активности процессов ПОЛ в кишечнике насекомых. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что неконтролируемое увеличение активности ПОЛ при питании ВМ растений, происходит при острых воздействиях [Barbehenn et al., 2001]. При менее острых влияниях концентрация гидропероксидов не менялась. В частности, при исследовании антиоксидантного статуса в кишечнике насекомых, питающихся на ген-модифицированном табаке с различной продукцией фенолов, не обнаружено достоверных отличий в концентрации гидропероксидов [Jonson, Felton, 2001]. В наших исследованиях мы использовали 0,1 % концентрации экстрактов растений, не обладающих выраженной антагонистической активностью. Можно предположить, что отмеченное нами снижение концентрации МДА, а, следовательно, и процессов ПОЛ является следствием активности компонентов антиоксидантной системы насекомых.

4.3. Изменение соотношения окисленных и восстановленных тиолов при воздействии вторичных метаболитов растений

При скармливании полярного экстракта пижмы, неполярного и полярного экстрактов багульника, а также неполярной вытяжки оленого мха зафиксировано достоверное увеличение окислительной модификации тиолов на 9 сутки эксперимента (Рис. 7). Питание насекомых кормом с содержанием неполярных экстрактов оленого мха, мха сфагнума и усниновой кислоты не сопровождалось изменением отношения окисленных и восстановленных тиолов по сравнению с контрольными вариантами.



Рис. 7 Изменение отношения RSSR/RSH в кишечнике личинок *G. mellonella* на девятые сутки после скармливания экстрактов растений (n=10; *p<0,05 по сравнению с контролем)

Увеличение показателя RSSR/RSH при скармливании полярного экстракта пижмы, неполярного и полярного экстрактов багульника, а также неполярной вытяжки оленего мха зарегистрировано на фоне снижения концентрации МДА в этих вариантах (Рис. 6). Это может свидетельствовать о нарушении окислительно-восстановительного гомеостаза в кишечнике личинок под действием ВМ, входящих в состав экстрактов растений подавляющих развитие насекомых.

Снижение концентрации МДА (в 2 раза) при питании насекомых усниновой кислотой, а также отсутствие изменений концентрации МДА и отношения RSSR/RSH при скармливании неполярного экстракта оленего мха и мха сфагнума может быть связано с антиоксидантными и антинутриентными свойствами ВМ [Emmerich et al., 1993; Jonson, Felton, 2001; Marante, 2003].

Полученные результаты подтверждают предположение, что отмеченное нами снижение концентрации МДА, а, следовательно, и процессов ПОЛ может являться следствием активности компонентов антиоксидантной системы насекомых.

4.4. Изменение активности ферментативных антиоксидантов и неспецифических эстераз при воздействии вторичных метаболитов растений

4.4.1. Активность глутатион-S-трансферазы

При скармливании экстрактов пижмы, багульника и оленего мха зафиксировано достоверное снижение активности ГТ на 9 сутки эксперимента в кишечнике насекомых (Рис. 8).

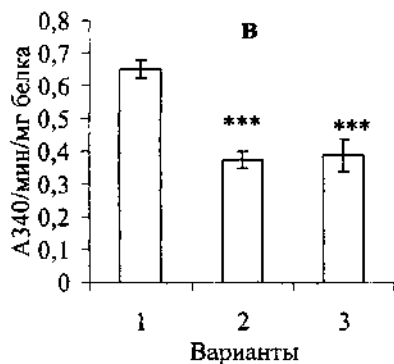
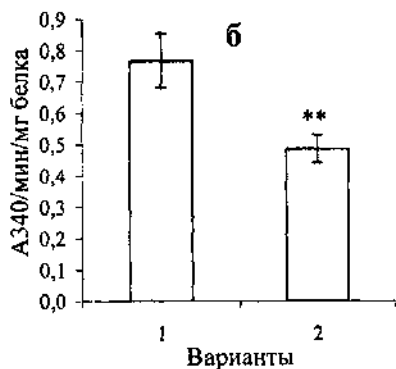
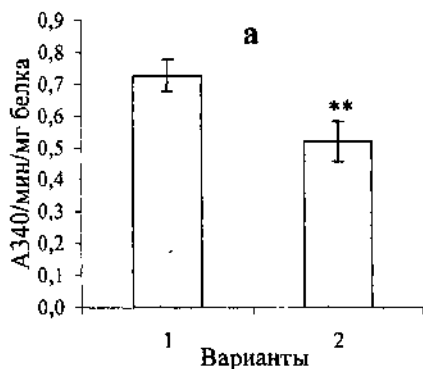


Рис. 8 Активность глутатион-S-трансферазы в кишечнике личинок *G. mellonella* при скармливании экстрактов растений: а- пижма обыкновенная; б- олений мох; в- багульник болотный, 1- контроль 2- полярный экстракт 3- неполярный экстракт (n=10; ***p<0,001, **p<0,01 по сравнению с контролем)

Снижение активности ГТ в кишечнике насекомых при скармливании экстрактов данных растений может быть следствием комплекса причин. Так, в ряде работ отмечается ингибирование ГТ насекомых ВМ растений. В частности, показана ингибирующая активность ГТ 45 аллелохимиков в основном фенольной природы [Lee, 1991; Chien, 1994; Yц, Abo-Eldhar, 2000; Yц, Huang, 2000]. Кроме того, обнаружены гликозиды, способные связываться с активным центром ГТ и глутатионом который необходим для работы этого фермента [Mukanganayama et al., 2003]. Известно, что основная функция ГТ – защита клеток от ксенобиотиков и продуктов ПОЛ это позволяет предположить, что снижение активности ГТ в кишечнике в вариантах с тестированием пижмы (полярный экстракт), багульника (полярный и неполярный экстракт) является следствием снижения активности ПОЛ, о чем свидетельствует пониженная концентрация МДА (Рис. 6).

4.4.2. Активность неспецифических эстераз

При изучении активности неспецифических эстераз в кишечнике насекомых достоверное изменение активности было зарегистрировано в

варианте со скормливанием экстрактов оленьего мха. При этом выявлено достоверное ($p < 0,001$) увеличение активности эстераз в кишечнике (в 1,3 раза).

Известно, что в экстрактах оленьего мха содержится усниновая кислота, которая обладает антимикробными свойствами, а также токсична для насекомых [Emmerich et al., 1993, Ingoldsdotter, 2002]. Не исключено, что индукция активности эстераз в кишечнике может быть направлена на инактивацию токсичных продуктов метаболизма усниновой кислоты. Данное предположение подтвердилось при исследовании активности неспецифических эстераз в кишечнике личинок *G. mellonella* при питании очищенной усниновой кислотой. У насекомых, питающихся 0,1% усниновой кислотой, было отмечено достоверное ($p < 0,001$) увеличение активности неспецифических эстераз (в 2 – 3 раза) по сравнению с контролем в течение всего опыта.

4.4.3. Активность супероксиддисмутазы и каталазы

Изучении активности СОД и каталазы в кишечнике насекомых при скормливании экстрактов растений не выявило корреляции между изменением активности этих ферментов, а также концентрацией МДА и тиолов. Можно предположить, что значение этих ферментативных антиоксидантов в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в кишечнике насекомых при воздействии ВМ растений является незначительным. Ряд исследований, проведенных зарубежными учеными, подтверждает наши предположения [Barbehenn et al., 2001; Barbehenn, 2002].

4.5. Влияние экстрактов растений на развитие бактериальной инфекции *Bacillus thuringiensis* у личинок *G. mellonella*

При совместном заражении насекомых бактериями БТ (в концентрации 1×10^7 , 1×10^8 спор/мл) и скормливании 0,1 % экстрактов растений пижмы обыкновенной, оленьего мха, мха сфагнума и усниновой кислоты не обнаружено достоверных отличий в смертности личинок.

Интерес вызывают результаты, полученные при совместном заражении личинок бактериями БТ (1×10^7) и скормливании экстрактов багульника. Зафиксировано достоверное ($p < 0,05$) снижение смертности в варианте с совместным применением БТ и полярного экстракта (в 2 раза), а также БТ и неполярного экстракта (в 2,5 раза).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что действие токсинов БТ на эпителиальные клетки кишечника приводит к нарушению целостности и функциональной активности клеточных мембран. Наши исследования, а также литературные данные свидетельствуют, что при этом происходит усиление активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Voctor, Salama, 1983; Штерншис, 1995]. В свою

очередь, анализ компонентов антиоксидантной системы показал увеличение активности антиоксидантов супероксиддисмутазы (СОД) и глутатион-S-трансферазы (ГТ) на фоне снижения активности каталазы, а также повышения уровня окисленных тиолов. Эти результаты свидетельствуют о том, что усиление активности перекисного окисления липидов в эпителиальных клетках кишечника под действием бактериальных токсинов приводит к образованию токсичных продуктов и активированных кислородных метаболитов (АКМ), которые повышают степень окисления тиолов, а также вызывают активацию таких компонентов антиоксидантной системы как СОД и ГТ. На вторые сутки после заражения отмечается снижение концентрации малонового диальдегида (МДА) и повышение до уровня контроля на третьи сутки. При этом отмечено повышение активности СОД и ГТ, а также повышения уровня окисления тиолов. Вероятно, повышенная активность компонентов антиоксидантной системы препятствует участию радикалов в развитии патофизиологических процессов, о чем свидетельствует снижение концентрации МДА и смертности насекомых на 2 и 3 сутки после заражения. Увеличение активности СОД, ГТ и уровня окисленных тиолов наряду со снижением активности каталазы в течение всего опыта, вероятно, связано с тем, что при развитии патологического процесса изменяются соотношения и взаимосвязи между компонентами антиоксидантной системы.

Анализ полученных нами результатов показал, что в течение первых суток после заражения БТ происходит резкое нарушение баланса между генерацией АКМ в организме насекомого и их ингибированием антиоксидантными системами, что характерно для состояния так называемого окислительного стресса. Этот термин широко применяется для описания дисбаланса в системе “оксиданты-антиоксиданты” при свободнорадикальных патологиях у позвоночных [Thomson et al., 1998; Reid, Tervit, 1999; Lefer, 2000; Robberecht, 2000; Aghdassi, Allard, 2000; Pavlick et al, 2002 и т.д.] и у насекомых [Pardini et al., 1988; Aucoin et al., 1991; Bi, Felton, 1991; Wang et al., 2001]. При окислительном стрессе усиливаются радикальные окислительные процессы, в частности ПОЛ. В конечном счете, эти процессы приводят к разрушению клеток эпителия и дисфункции кишечника насекомых.

Таким образом, усиление деструктивных процессов в результате развития окислительного стресса, вероятно, является одним из важных патофизиологических факторов заболевания, влияющих на развитие бактериальной инфекции вызываемой БТ у насекомых. При этом антиоксидантная система участвует в защитных механизмах, позволяющих контролировать развитие инфекционного процесса за счет ингибирования свободнорадикальных реакций, сопутствующих начальным этапам бактериоза и поддержания окислительно-восстановительного баланса, необходимого для протекания репарационных и иммунных процессов, а также сохранения структурного гомеостаза организма насекомых.

В наших исследованиях установлено, что изменения в антиоксидантном статусе личинок *G. mellonella* происходят как при острых бактериозах, так и

под действием вторичных метаболитов растений, не обладающих ярко выраженными антагонистическими свойствами, то есть не приводящих к гибели насекомых.

Следует отметить, что ВМ растений могут реализовывать свое негативное действие с помощью многочисленных механизмов [Шапиро и др., 1986; Чернышов, 1996]. Отмеченное нами увеличение показателя $RSSR/RSH$ при скармливании экстрактов растений происходило на фоне снижения концентрации МДА, что может свидетельствовать о нарушении окислительно-восстановительного гомеостаза.

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что отмеченное нами снижение уровня ПОЛ может происходить вследствие активности компонентов антиоксидантной системы. При этом активность ГТ в кишечнике снижается, а активности СОД и каталазы практически не изменяются. Но показатель $RSSR/RSH$ во всех вариантах, где отмечалось снижение концентрации МДА, достоверно превышал контрольные значения. Исходя из этого, можно сделать вывод, что при питании насекомых кормом, содержащим ВМ растений, обладающих антагонистическими свойствами, происходит нарушение окислительно-восстановительного баланса в кишечнике, при этом первостепенную роль в поддержании структурного гомеостаза играют неферментативные антиоксиданты – тиол-содержащие соединения.

Достоверное снижение смертности при совместном заражении личинок бактериями БТ и скармливании экстрактов багульника может быть связано с рядом причин. Так, изменение окислительно-восстановительного баланса при скармливании экстракта багульника, может сопровождаться воздействием реакционноспособных АКМ на протеазы, участвующие в активации бактериального токсина. Кроме того, ВМ, также могут связываться с протеазами или белковым бактериальным токсином, снижая их активность.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что развитие бактериоза, а также воздействие экстрактов ряда растений, подавляющих развитие насекомых, сопровождается изменением баланса “оксиданты-антиоксиданты” в кишечнике личинок *G. mellonella*. При этом ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы выступают одним из защитных механизмов, предотвращающих разрушающее действие высокоактивных радикалов.

ВЫВОДЫ

1. Заражение личинок *G. mellonella* бактериями *Bacillus thuringiensis* приводит к усилению процессов перекисного окисления липидов в кишечнике на первые сутки после заражения с последующим снижением до контрольных значений.
2. Развитие бактериальной инфекции сопровождается увеличением активности супероксиддисмутазы и глутатион-S-трансферазы, снижением активности

каталазы, а также увеличением окисления тиол-содержащих компонентов в кишечнике личинок *G. mellonella*.

3. Экстракты: пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare*, багульника болотного *Ledum palustre*, оленего мха *Cladonia uncialis*, мха сфагнума *Sphagnum* и усиновая кислота подавляют развитие личинок *G. mellonella*.

4. Скармливание экстрактов растений, обладающих антагонистическим действием на личинок *G. mellonella*, приводит к снижению активности процессов перекисного окисления липидов на фоне повышения окислительной модификации тиолов в кишечнике.

5. Питание личинок *G. mellonella* экстрактами растений с антагонистическим действием сопровождается снижением активности глутатион-S-трансферазы и отсутствием изменений активности супероксиддисмутазы и каталазы в кишечнике насекомых.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Глупов В.В., Хвощевская М.Ф., Крюкова Н.А., Лозинская Я.Л., **Дубовский И.М.**, Мартемьянов В.В. Формирование клеточного иммунитета насекомых (Insecta): образование активированных кислородных метаболитов в гемоцитах // Беспозвоночные животные Южного Зауралья и сопредельных территории: Материалы Всероссийской конференции. Курган. – 1998. – С.93-95.

2. Khvoshevskaya M.F., Krukova N.A., Lozinskaya J.L., **Dubovski I.M.**, Martemyanov V.V., Glupov V.V. Metabolic activity in haemocytes of insects // Book of Abstracts. VIth European Congress of Entomology (Brunnhof V. & Soldan T. eds.), Ceske Budejovice. August 23-29. – 1998. – P.73.

3. Лозинская Я.Л., **Дубовский И.М.**, Мартемьянов В.В. Изменение фенолоксидазной активности гемолимфы *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при ранении и инъектировании *Escherichia coli* // Паразиты в природных комплексах и рисковые ситуации. Новосибирск. – 1998. – С.86-89.

4. Хвощевская М.Ф., Лозинская Я.Л., Крюкова Н.А., **Дубовский И.М.**, Мартемьянов В.В. Продукция активированных кислородных метаболитов гемоцитами насекомых лесных вредителей // Сохранение и защита горных лесов: Материалы международного симпозиума (ред. Токторолиев Б.А.). Ош. 5-10 октября. – 1999. – С.26-28.

5. **Дубовский И.М.**, Глупов В.В. Влияние низкой температуры на популяционную структуру гемоцитов личинок Большой пчелиной огнёвки *Galleria mellonella* L. (Pyralididae; Lepidoptera) при инфекционном процессе // Регуляция численности беспозвоночных и фитопатогенов. Новосибирск. – 1997. – С.33-38.

6. **Дубовский И.М.**, Мартемьянов В.В. Изменение популяционной структуры гемоцитов *Galleria mellonella* при инфекционном процессе // Паразиты и

вызываемые ими болезни в Сибири (ред.Волков Ф.А). Новосибирск. – 1997. – С.46.

7. **Дубовский И.М.**, Мартемьянов В.В. Изменение метаболической активности гемоцитов личинок большой вошиной огневки *Galleria mellonella* при патогенезе // Материалы XXXVI международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”(ред.Невинский Г.А.). Новосибирск. – 1998. – С.7-8.

8. Глупов В.В., Хвощевская М.Ф., **Дубовский И.М.**, Мартемьянов В.В. Метаболическая активность гемоцитов насекомых при фагоцитозе. Проблемы энтомологии в России(Медведев Г.С.). Санкт-Петербург. 23-26 сентября. – 1998. – Т.1. – С.84-85.

9. Омелянчук Л.В., **Дубовский И.М.**, Глупов В.В. Регуляторный ген феноксидазной активности у *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2001. – Т.37. – С.1062-1067.

10. Glupov V.V., Khvoshevskaya M.F., Lozinskaya Y.L., **Dubovskiy I.M.**, Martem'yanov V.V., Sokolova J.Y. Application of the method NBT-reduction for studies on the production of reactive oxygen species in Insect haemocytes. Cytobios. – 2001. – V.106. – P.165-178.

11. **Дубовский И.М.**, Слепнева И.А., Комаров Д.А., Глупов В.В. Изучение тиолсодержащих компонентов гемолимфы у насекомых отряда Lepidoptera // XII Съезд Русского энтомологического общества. Санкт-Петербург, 19-24 августа – 2002. – С.106.

12. **Dubovski I.M.**, Slepneva I.A., Komarov D.A., Glupov V.V. The study of SH-compounds in haemolymph of insects (Lepidoptera) // Book of Abstracts, VIIth European Congress of Entomology, Thessaloniki, Greece, October 7-13. – 2002. – P.30.

13. Glupov V.V., Slepneva I.A., Serebrov V.V., Khvoshevskaya M.F., Martem'yanov V.V., **Dubovskiy I.M.**, Khramtsov V.V. Influence of the fungal infection on the production of reactive metabolites and the antioxidant state of haemolymph of *Galleria mellonella* larvae // Russian Entomol.J. – 2003. – V.12 – P.103-108.

14. Zvereva E.L., Serebrov V.V., Glupov V.V., **Dubovskiy I.M.** Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. – 2003. – V.135. – P.383-391.

15. Хвощевская М.Ф., **Дубовский И.М.**, Глупов В.В. Изменение активности супероксиддисмутазы в разных органах личинок большой вошиной огневки (*Galleria mellonella* L., Lepidoptera: Pyralidae) при заражении *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae* // Известия РАН, сер.биол. – 2004. – №6 – С.613-619.

16. **Дубовский И.М.**, Олифиренко О.А., Глупов В.В. Уровень и активность антиоксидантов в кишечнике личинок *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) при пероральном инфицировании бактериями *Bacillus thuringiensis ssp galleriae* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2005 – Т.41. – С.18-22.

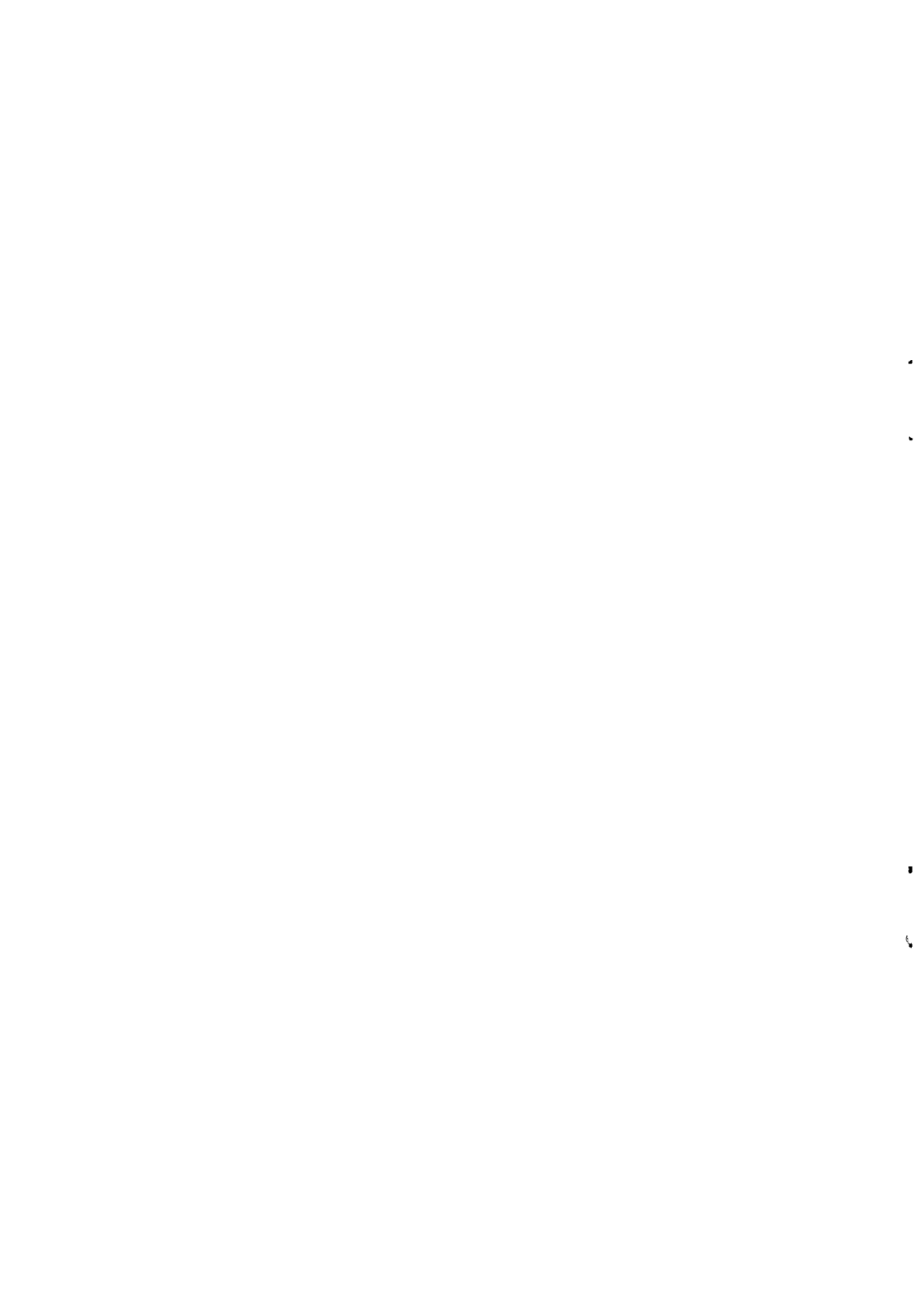
•

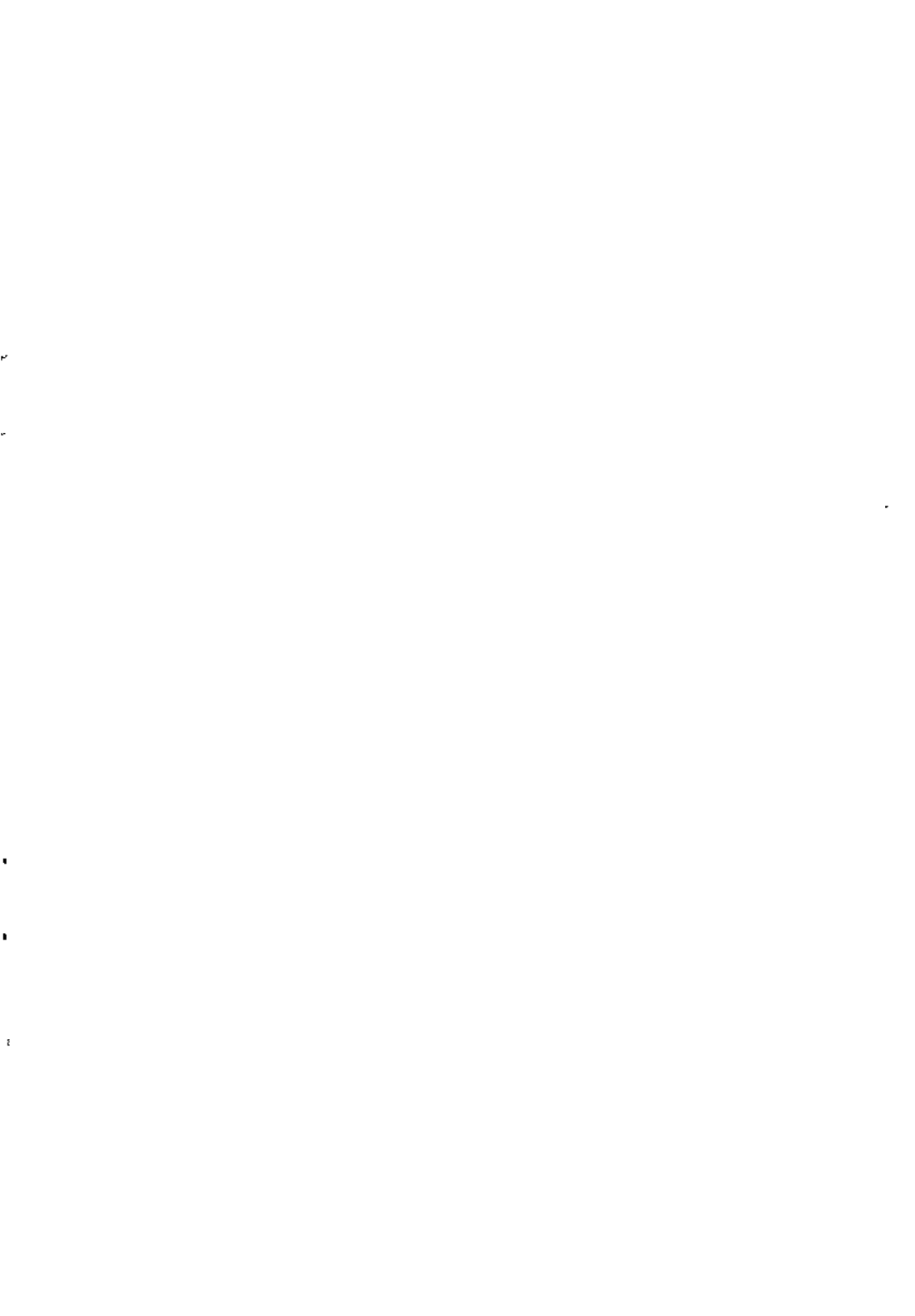
•

•

•

•





№ - - 20

РНБ Русский фонд

2006-4

1715