

*На правах рукописи*

ГРИЗАНОВА  
Екатерина Валерьевна

**ИММУННЫЙ ОТВЕТ, СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И  
ДЕТОКСИЦИРУЮЩЕЙ СИСТЕМ ЛИЧИНОК БОЛЬШОЙ ВОЩИННОЙ  
ОГНЕВКИ *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA, PYRALIDAE)  
ПРИ БАКТЕРИОЗАХ, ВЫЗВАННЫХ *BACILLUS THURINGIENSIS***

03.02.05 – энтомология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2012

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института систематики и экологии животных СО РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук,  
Дубовский Иван Михайлович  
(Институт систематики и экологии  
животных СО РАН,  
г. Новосибирск, с.н.с.)

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Штерншис Маргарита Владимировна  
(Новосибирский государственный  
аграрный университет, г. Новосибирск,  
проф. каф. энтомол. и биологической  
защиты растений)

доктор биологических наук, профессор  
Пономарев Василий Иванович  
(Ботанический сад УрО РАН,  
г. Екатеринбург, зав. лаб.  
лесовосстановления, защиты леса  
и лесопользования)

Ведущее учреждение: Санкт-Петербургский государственный  
аграрный университет, Санкт-Петербург

Защита состоится 14 декабря в \_12\_ часов на заседании  
диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и  
экологии животных СО РАН по адресу: 630091, г. Новосибирск,  
ул. Фрунзе, 11.

Факс: (383)2170-09-73, e-mail: [dis@eco.nsc.ru](mailto:dis@eco.nsc.ru)

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

Автореферат разослан \_ ноября 2012 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Л.В. Петрожицкая

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследований.** В динамике популяций насекомых существенную роль играют энтомопатогенные микроорганизмы (бактерии, грибы, вирусы, микроспоридии), среди которых широко представлены бактерии группы *Bacillus thuringiensis/cereus*. Данные бактерии встречаются повсеместно и могут вызывать эпизоотии, которые могут существенно влиять на численность насекомых.

В ходе эволюции у насекомых сформировались различные защитные механизмы, предотвращающие проникновение и развитие инфекций. Данные механизмы могут быть условно разделены на этологические, экологические, морфо-физиологические и биохимические. В свою очередь патогены выработали множество способов, обеспечивающих успешное проникновение и развитие в организме хозяина. Кристаллообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* (БТ) синтезируют различные метаболиты, токсичные для насекомых, в том числе кристаллический белковый  $\delta$ -эндотоксин. Предполагается, что наличие данного токсина, обладающего также антибактериальной активностью, помогает бактериям занимать различные экологические ниши в природе, однако, было показано, что он может вызывать токсикоз у насекомых.

Первым эффективным барьером для предотвращения возникновения кишечных инфекций являются морфологические структуры кишечника. В частности, передний и средний отделы кишечника выстланы хитиновой интимой, а в среднем отделе кишечника имеется перитрофическая мембрана, которая может защищать от механических повреждений и инфекционных агентов. Кроме того, в кишечнике существуют и биохимические барьеры, в первую очередь пищеварительные ферменты, которые способны разрушать бактерии и их метаболиты. У некоторых насекомых отряда *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* пищеварительные ферменты могут активировать бактериальный кристаллический белковый  $\delta$ -эндотоксин БТ, вызывающий повреждения эпителиальных клеток кишечника. Существуют небольшое количество работ, в которых показано, что при незначительном инфицировании насекомых происходит активизация процессов репарации, способствующих избеганию бактериальной инфекции (Buchon et al., 2009). При этом вопрос о роли иммунной системы насекомых при сублетальных и полублетальных инфекциях БТ остается малоизученным.

У насекомых, как и у позвоночных, при воспалительных кишечных инфекциях происходит генерация активированных кислородных метаболитов (АКМ), обладающих высокой реакционной способностью. Они способны уничтожать бактерии, но в тоже время могут деструктивно воздействовать на ткани и органы хозяев. Для нейтрализации этих соединений, в процессе эволюции возникла группа ферментов и соединений не ферментативной природы (белки, пептиды, гликопротеины, липопротеины), обладающих антиоксидантной и детоксицирующей активностью. Эти соединения особенно важны на первых этапах кишечной инфекции, вызванной БТ, когда происходит генерация большого количества АКМ. Существуют лишь единичные работы по изучению антиоксидантной и детоксицирующей систем насекомых при бактериозе (Dubovskiy et al., 2008), и вклад этих защитных систем в формирование устойчивости насекомых к БТ практически не изучен. При этом следует отметить, что в природных популяциях насекомых редко отмечаются острые инфекции. В тоже время слабое инфицирование насекомых различными микроорганизмами регистрируется постоянно. К настоящему времени не изучено, каким образом подобного рода инфекционная нагрузка может влиять на организм насекомых. В связи с этим нами были поставлены следующие цель и задачи исследования.

**Цель исследования** – изучить вклад механизмов клеточного и гуморального иммунитета, компонентов антиоксидантной и детоксицирующей системы в конституционную и индуцированную резистентность большой вошинной огневки *Galleria mellonella* к кристаллообразующим бактериям *Bacillus thuringiensis*.

**Задачи исследования:**

1. Изучить показатели клеточного и гуморального иммунного ответа личинок *G. mellonella* при развитии острых и сублетальных бактериальных инфекций, вызванных *B. thuringiensis*.

2. Оценить активность реакций клеточного и гуморального иммунного ответа, антиоксидантной и детоксицирующей системы личинок *G. mellonella* при селекции на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis*.

3. Изучить показатели клеточного и гуморального иммунного ответа, антиоксидантной и детоксицирующей системы у селектированных на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis* личинок *G. mellonella* при развитии бактериоза.

4. Оценить активность и вклад неспецифических эстераз в формирование устойчивости личинок огневки *G. mellonella* к бактериям *B. thuringiensis*.

**Научная новизна работы.** Установлено, что заражение личинок *G. mellonella* сублетальной дозой бактерий *B. thuringiensis* приводит к стимуляции активности клеточных и гуморальных реакций иммунной системы насекомых. Впервые установлено, что формирование устойчивости личинок *G. mellonella* к бактериям *B. thuringiensis* приводит к увеличению уровня экспрессии антимикробных пептидов в жировом теле насекомых. Получены уникальные данные, свидетельствующие о том, что у устойчивых к бактериям *B. thuringiensis* личинок *G. mellonella* при заражении данным патогеном наблюдается усиленная экспрессия антимикробных пептидов в кишечнике. Выявлено, что ингибирование неспецифических эстераз кишечника личинок *G. mellonella* приводит к увеличению чувствительности насекомых к бактериям *B. thuringiensis*.

**Практическая значимость работы.** На основе полученных данных, показывающих увеличение чувствительности насекомых к бактериям *B. thuringiensis* при ингибировании неспецифических эстераз кишечника, можно разработать рекомендации по введению в состав биопрепаратов на основе бактерий *B. thuringiensis* химических ингибиторов эстераз, что в дальнейшем может быть использовано при создании новых комплексных препаратов используемых в регуляции численности насекомых – вредителей сельского и лесного хозяйства и безвредных для окружающей среды. Результаты, представленные в диссертации, могут быть использованы при чтении лекций по экологической физиологии насекомых и интегрированной защите растений в различных высших учебных заведениях России.

**Апробация работы.** Материалы, полученные в ходе исследований, были представлены на IV Съезде паразитологического общества РАН «Паразитология в XXI веке: проблемы, методы, решения» (Санкт-Петербург, 2008), съезде королевского энтомологического общества «Иммунитет насекомых» (Шеффилд, Великобритания, 2009), III Межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока, посвященной 80-летию проф. К.П. Федорова (Новосибирск, 2009), IX европейском конгрессе

энтомологов (Будапешт, Венгрия, 2010), VIII Межрегиональном совещании энтомологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2010), Международной научной конференции «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке» (Санкт-Петербург, 2011), XIV съезде русского энтомологического общества (Санкт-Петербург, 2012) и межлабораторных семинарах ИСиЭЖ СО РАН (2010, 2012).

**Публикации.** По результатам исследований опубликовано 11 научных работ, в том числе 7 статей в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста; состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 33 рисунками. Список литературы включает 216 работ, из них 186 на иностранных языках.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. И.М. Дубовскому за участие и всестороннюю поддержку, неоценимую помощь на всех этапах исследования; д.б.н., профессору В.В. Глупову за помощь при обсуждении результатов и ценные критические замечания при подготовке диссертации; к.б.н. Н.А. Крюковой за ценные замечания, сделанные при работе с рукописью; Бурцевой Л.И. и Ходыреву В.П. за помощь в проведении микробиологической части работы. Особую благодарность автор выражает Богомоловой Н.В. за поддержку на всех этапах выполнения работы. За помощь в проведении экспериментальной работы автор признателен всем сотрудникам лаборатории патологии насекомых (ИСиЭЖ СО РАН), Адамовой А. (НГАУ), а также сотрудникам Отдела прикладной энтомологии (Swansea University, Wales, Great Britain).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В литературном обзоре дана характеристика кристаллообразующих бактерий *Bacillus thuringiensis*, их токсинов и механизмов действия на насекомых, отражены различные механизмы адаптации этих бактерий к природным условиям. Рассмотрены

механизмы резистентности насекомых к инфекциям на физиологическом и биохимическом уровне. В первую очередь рассмотрена иммунная, антиоксидантная и детоксицирующая системы организма насекомых. Особое внимание уделено роли бактерий в популяционной динамике насекомых, а также формированию устойчивых к бактериям линий насекомых. Проведен анализ работ по изучению механизмов резистентности насекомых к бактериям *B. thuringiensis*.

## Глава 2. Материалы и методы

Объектом исследований служили личинки большой вошинной огневки *Galleria mellonella* лабораторной популяции (ИСиЭЖ СО РАН). Для заражения насекомых использовали споро-кристаллическую смесь бактерий *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae* и ssp. *tompsoni* из коллекции лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН. Заражение личинок *G. mellonella* проводили перорально. Селекцию личинок *G. mellonella* на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis* проводили каждую генерацию при содержании насекомых на искусственной питательной среде, в которую была добавлена споро-кристаллическая смесь бактерий *B. thuringiensis* ssp. *galleriae*. Для ингибирования неспецифических эстераз кишечника использовали химический ингибитор неспецифических эстераз трифенилфосфат (трифениловый эфир фосфорной кислоты) (Досон и др., 1991).

Приготовление образцов органов и тканей для измерения активности ферментов проводили по стандартным методикам (Dubovskiy et al., 2010, 2011). Общая РНК из образцов жирового тела и ткани кишечника была выделена с использованием гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции (TRIzol®). Определение уровня экспрессии генов, отвечающих за синтез антимикробных пептидов, проводили с помощью реакции обратной транскрипции ПЦР в реальном времени (Vogel et al., 2011). Интенсивность инкапсуляции у насекомых оценивали по степени потемнения нейлоновых имплантантов (Dubovskiy et al., 2008, 2010, 2011). Активность фагоцитоза определяли с помощью инъекции ФИТЦ-меченных клеток *Escherichia coli* в гемоцель насекомых (Dubovskiy et al., 2008). Активность фенолоксидаз в гемоцитах и плазме определяли, используя метод Ashida и Söderhäll (1984) с изменениями (Dubovskiy et al., 2008). Антибактериальную активность гемолимфы определяли по методу описанному Wojda et al. (2004). Определение

индекса коагуляции гемолимфы насекомых проводили по степени изменения концентрации красителя при инъекции раствора амарантового красного в гемоцель насекомых (Haine et al., 2007). Активность каталазы в кишечнике насекомых определяли спектрофотометрически при 240 нм по скорости разложения перекиси водорода (Wong et al., 1991). Активность супероксиддисмутазы определяли спектрофотометрически при 560 нм по подавлению скорости восстановления нитросинего тетразолия супероксид-анионом, образующимся в процессе окисления ксантина ксантиноксидазой (McCord, Fridovich, 1969). Для определения концентрации восстановленных (RSH) и окисленных (RSSR) тиолов использовали спектрофотометрический метод, основанный на окислении RSH 2-нитро 5-тиобензойной кислотой (Khrantsov et al., 1989, 1997). Активность неспецифических эстераз оценивали спектрофотометрически по образованию нитрофенила при длине волны 410 нм по методу Prabhakaran et al. (1995) с изменениями (Dubovskiy et al., 2010, 2011). Активность глутатион-S-трансфераз (ГСТ) определяли спектрофотометрически по образованию 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона при длине волны 340 нм, по методу Хабига (Habig et al., 1974) с изменениями (Dubovskiy et al., 2010, 2011). Концентрацию белка в образцах насекомых определяли по методу Бредфорда (1976). Активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности ( $\Delta A$ ) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку (SE). Для проверки нормальности распределения данных использовали *W* критерий Шапиро-Уилка. Для анализа выживаемости насекомых при заражении бактериями использовали Cox-Mantel тест. Статистическую значимость различий изучаемых параметров с нормальным распределением определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом (post-hoc Tukey HSD). Для определения статистической значимости различий для не нормально распределенных данных использовали Mann–Whitney U-test (лизоцим подобная антибактериальная активность) и однофакторный дисперсионный анализ (Kruskal-Wallis) с последующим (Dunn's) тестом (экспрессия АМП) (STATISTICA 6.0; Prism 5.0).



## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Иммунный ответ личинок *Galleria mellonella* при полулетальной и сублетальной бактериальной инфекции, вызванной *Bacillus thuringiensis*

При изучении влияния бактериальной инфекции на иммунную систему насекомых мы моделировали сублетальную (ЛК15) и полулетальную (ЛК50) кишечную инфекцию, для чего насекомых перорально заражали различными концентрациями бактерий *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae* (БТ). Заражение личинок *G. mellonella* сублетальной концентрацией БТ приводило к достоверному увеличению активности реакций клеточного иммунного ответа – фагоцитоза и инкапсуляции (рис. 1Б, 1В). При инфицировании личинок *G. mellonella* полулетальной дозой бактерий было отмечено достоверное снижение активности фагоцитоза (рис. 1Б), инкапсуляции (рис. 1В), а также активности фенолоксидаз в гемоцитах (рис. 1Г). Было показано, что питание личинок *G. mellonella* кормом с содержанием сублетальной и полулетальной концентрации бактерий БТ приводит к достоверному ( $p < 0.05$ ) снижению общего количества гемоцитов (рис. 1А).

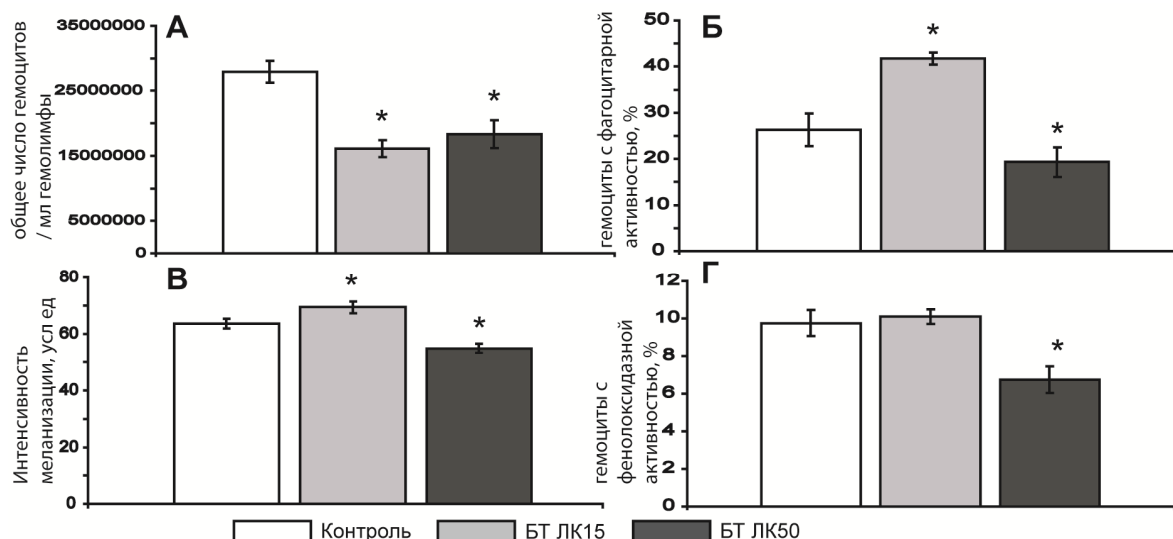


Рис. 1. Активность реакций клеточного иммунного ответа и общее число гемоцитов у личинок *G. mellonella* при заражении сублетальной (БТ ЛК15) и полулетальной (БТ ЛК50) дозой бактерий *B. thuringiensis* на третьи сутки после инфицирования: (А) общее количество гемоцитов; (Б) активность фагоцитоза; (В) интенсивность инкапсуляции; (Г) активность фенолоксидаз в гемоцитах (\* $p \leq 0.05$  по сравнению с контролем).

Полученные данные согласуется с результатами других исследователей (Dubovskiy et al., 2008). Вероятно, снижение общего числа гемоцитов происходит за счет снижения гемопоэза на фоне инфекции и/или участия клеток гемолимфы в репарационных процессах.

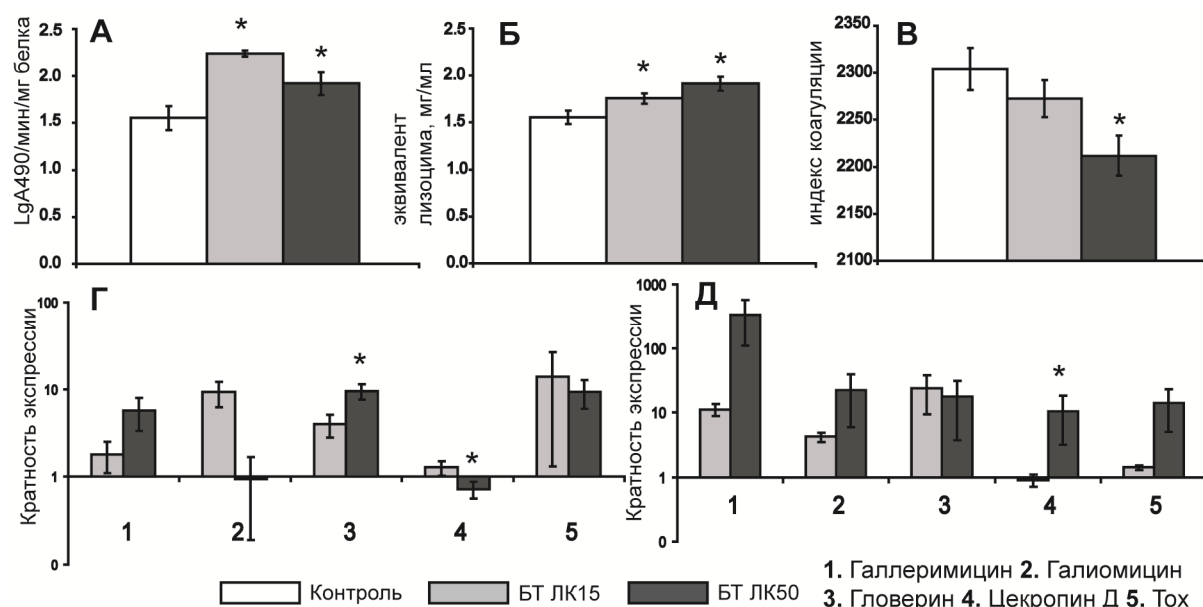


Рис. 2. Активность реакций гуморального иммунного ответа личинок *G. mellonella* при заражении сублетальной (БТ ЛК15) и полулетальной (БТ ЛК50) дозой бактерий *B. thuringiensis* на третьи сутки после инфицирования: (А) активность фенолоксидаз в плазме; (Б) лизоцим-подобная активность плазмы; (В) индекс коагуляции гемолимфы (\* $p \leq 0.05$  по сравнению с контролем); (Г) уровень экспрессии антибактериальных пептидов в жировом теле инфицированных насекомых относительно контроля; (Д) уровень экспрессии антибактериальных пептидов в кишечнике инфицированных насекомых относительно контроля (\* $p \leq 0.05$  по сравнению насекомыми, зараженными БТ ЛК15).

При заражении личинок *G. mellonella* как сублетальной, так и полулетальной концентрацией БТ было зафиксировано увеличение фенолоксидазной (рис. 2А) и антибактериальной активностей плазмы (рис. 2Б) на первые, вторые и третьи сутки после заражения. Однако заражение насекомых высокой концентрацией бактерий (ЛК50) приводило к стабильному снижению индекса коагуляции гемолимфы у инфицированных насекомых ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем. Увеличение активности реакций гуморальной иммунной системы у насекомых, инфицированных сублетальной дозой БТ, может быть связано со стимулирующим эффектом низких концентраций бактерий на иммунный ответ насекомых. Наблюдаемое снижение активности коагуляции (рис. 2В) на фоне высокой фенолоксидазной активности

плазмы при полулетальной бактериальной инфекции (рис. 2А) может быть связано с недостатком клеточного компонента коагуляции – гемоцетина, вследствие уменьшения общего количества гемоцитов. Кроме того, не исключено, что при интоксикации кишечник может вырабатывать специфические ингибиторы, например ингибиторы протеаз, которые будут непосредственно блокировать каскад активации коагуляции в результате ограниченного протеолиза, что соответственно скажется на образовании коагулогена. Также нами было показано, что уровень синтеза антимикробных пептидов значительно увеличивается в жировом теле и кишечнике у насекомых в ответ на полулетальную пероральную бактериальную инфекцию (рис. 2Г, 2Д).

Таким образом, иммунная система может существенно влиять на формирование индуцированной резистентности насекомых к бактериям БТ и может принимать участие в защите организма насекомого при бактериальной кишечной инфекции.

### **3.2. Иммунная, антиоксидантная и детоксицирующая системы личинок *G. mellonella* при селекции на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis***

При селекции личинок *G. mellonella* на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis* было показано, что уже у пятого поколения происходит достоверное ( $p < 0.05$ ) снижение чувствительности селектированных насекомых к бактериям на 15% по сравнению с насекомыми контрольной линии. Выживаемость насекомых десятого поколения селектированной линии при заражении бактериями БТ была на 30% больше по сравнению с контрольной линией ( $p < 0.05$ ). Увеличение устойчивости насекомых при селекции бактериями зарегистрировано в многочисленных исследованиях (Oppert et al., 1994; Forcada et al., 1996; Rahman et al., 2004; Sarjan et al., 2009). Однако в большинстве случаев отмечается многократное увеличение устойчивости (в 10-100 раз) и при этом показано, что ключевыми факторами, определяющими столь сильный эффект, являются неполное растворение кристалла эндотоксина, неправильное расщепление протоксина в результате ограниченного протеолиза, а так же мутации рецепторов для связывания токсина (Bravo et al., 2005).

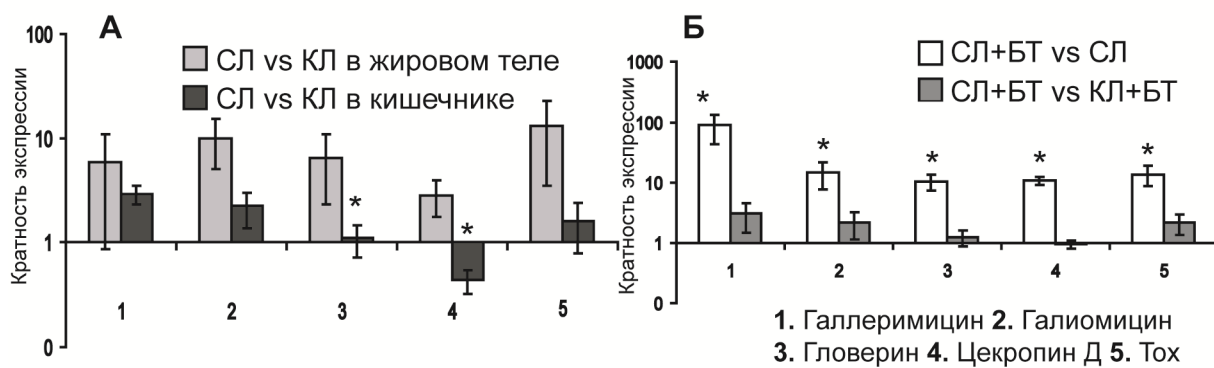


Рис. 3. (А) Экспрессия антимикробных пептидов в кишечнике и жировом теле личинок *G. mellonella* десятого поколения (F10) селектированной линии по сравнению с контрольной линией (\* $p \leq 0.05$  по сравнению с уровнем в жировом теле); (Б) Экспрессия антимикробных пептидов в кишечнике личинок селектированной линии *G. mellonella* десятого поколения (F10) при заражении бактериями *B. thuringiensis* (СЛ+БТ) относительно не зараженных насекомых селектированной линии (СЛ) и контрольной линии, зараженной бактериями *B. thuringiensis* (КЛ+БТ) (\* $p \leq 0.05$  по сравнению с вариантом СЛ+БТ vs КЛ+БТ).

Было установлено, что заражение насекомых селектированной линии полулетальной концентрацией бактерий БТ приводит к активации уровня экспрессии антибактериальных пептидов в кишечнике (рис. 3Б), т.е. непосредственно в месте развития инфекции, по сравнению с зараженными насекомыми контрольной линии. Также следует отметить, что уровень экспрессии АМП в жировом теле и кишечнике не зараженных насекомых селектированной линии был выше, чем у насекомых контрольной линии (рис. 3А). Вероятно, локальная индукция экспрессии АМП в кишечнике личинок *G. mellonella* селектированной линии может быть одним из механизмов устойчивости насекомых к бактериям при развитии инфекции.

При изучении активности компонентов антиоксидантной системы у личинок *G. mellonella* селектированной линии было зарегистрировано достоверное увеличение активности супероксиддисмутазы (рис. 4А) и отношения окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSH) (рис. 4В) в кишечнике насекомых пятого и десятого поколения обеих линий, инфицированных полулетальной концентрацией бактерий БТ. Кроме того, было отмечено достоверное ( $p < 0.05$ ) снижение активности каталазы в кишечнике зараженных личинок *G. mellonella* пятого и десятого поколения селектированной и контрольной линии (рис. 4Б). Однако наблюдалось достоверное ( $p < 0.05$ ) увеличение активности каталазы в

кишечнике не зараженных насекомых десятого поколения селектированной линии при сравнении с контролем (рис. 4Б).

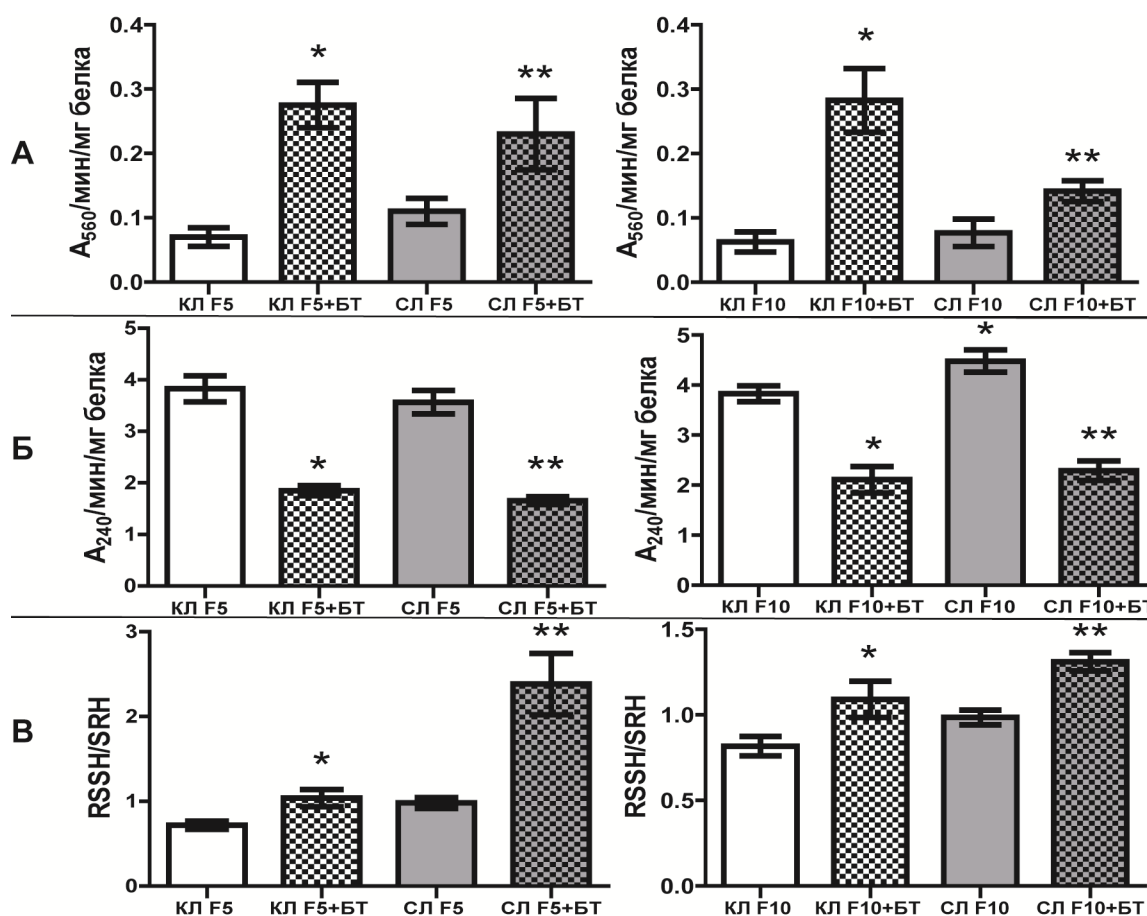


Рис. 4. Активность компонентов антиоксидантной системы в кишечнике личинок *G. mellonella* пятого (F5) и десятого (F10) поколения селектированной (СЛ) и контрольной линии (КЛ) при заражении бактериями *B. thuringiensis* (СЛ+БТ; КЛ+БТ) на вторые сутки после инфицирования: (А) – активность супероксиддисмутазы; (Б) – активность каталазы; (В) – соотношение тиолов RSSR/RSR (\* $p \leq 0.05$  по сравнению с не зараженной контрольной линией, \*\* $p \leq 0.05$  по сравнению с не зараженной селектированной линией).

Смещение баланса в сторону образования окисленных тиолов (увеличение отношения RSSR/RSR), а также увеличение активности супероксиддисмутазы на вторые сутки после заражения насекомых полулетальной концентрацией бактерий может свидетельствовать о повышенной активности радикальных окислительных процессов в кишечнике личинок *G. mellonella* под действием  $\delta$ -эндотоксина бактерий БТ. При этом повышенная активность каталазы у незараженных личинок *G. mellonella* десятого поколения селектированной линии, вероятно, дает преимущество насекомым к быстрой и эффективной защите организма от АКМ, в частности,

перекиси водорода на начальном этапе развития бактериальной инфекции.

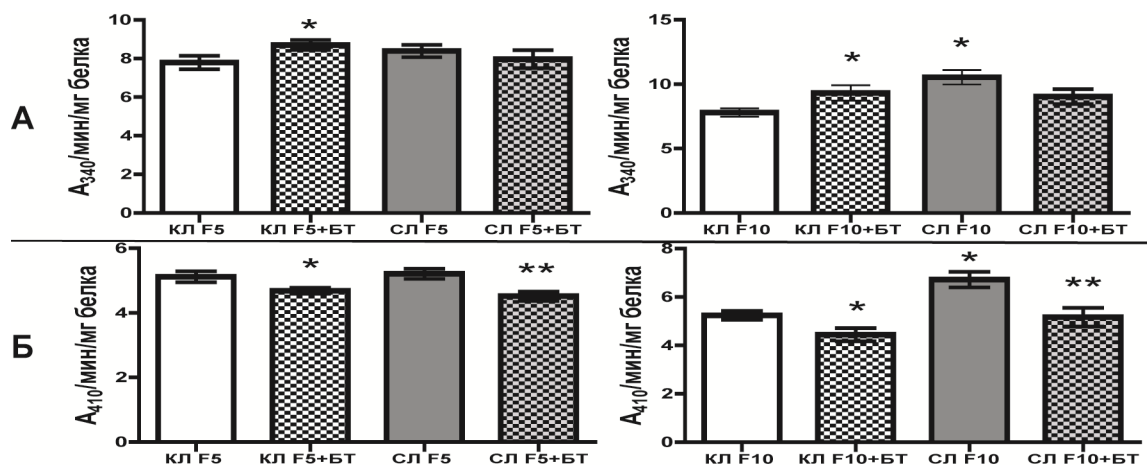


Рис. 5. Активность компонентов детоксицирующей системы в кишечнике личинок *G. mellonella* пятого (F5) и десятого (F10) поколения селектированной (СЛ) и контрольной линии (КЛ) при заражении бактериями *B. thuringiensis* (СЛ+БТ; КЛ+БТ) на вторые сутки после инфицирования: (А) – активность глутатион-S-трансферазы; (Б) – активность неспецифических эстераз (\* $p \leq 0.05$  по сравнению с не зараженной контрольной линией, \*\* $p \leq 0.05$  по сравнению с не зараженной селектированной линией).

Активность глутатион-S-трансферазы (ГСТ) была достоверно ( $p < 0.05$ ) выше на вторые сутки эксперимента в кишечнике зараженных бактериями БТ личинок *G. mellonella* пятого и десятого поколения контрольной линии и не изменялась у насекомых селектированной линии по сравнению с незараженными насекомыми (рис. 5А). Однако, было показано достоверное ( $p < 0.05$ ) увеличение активности данного фермента у незараженных личинок *G. mellonella* десятого поколения селектированной линии по сравнению с насекомыми контрольной линии (рис. 5А). Активность неспецифических эстераз кишечника у селектированных личинок *G. mellonella* десятого поколения была достоверно выше ( $p < 0.05$ ) по сравнению с насекомыми контрольной линии (рис. 5Б). При заражении насекомых бактериями БТ в полулетальной дозе наблюдалось достоверное снижение активности неспецифических эстераз кишечника ( $p < 0.05$ ) у личинок *G. mellonella* пятого и десятого поколения селектированной и контрольной линий (рис. 5Б).

Отмеченный повышенный уровень активности ГСТ у насекомых селектированной линии без воздействия бактерий, вероятно, свидетельствует о повышенной способности организма к инактивации органических гидроперекисей клеток и, соответственно, к защите

тканей от потенциального повреждения продуктами перекисного окисления липидов. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, свидетельствующих о снижении активности неспецифических эстераз у насекомых при заражении бактериями БТ, а так же у насекомых, устойчивых к токсину БТ (Gunning et al., 2005; Dubovskiy et al., 2008). Кроме того, при заражении устойчивых насекомых бактериями БТ также было показано достоверное снижение уровня эстераз (Gunning et al., 2005). Исходя из выше изложенного, можно предположить, что снижение активности фермента связано с его участием в процессах детоксикации метаболитов бактерий и продуктов, образующихся при токсикозе в клетках кишечника. При этом повышенный базовый уровень активности неспецифических эстераз, вероятно, является ключевым механизмом формирования устойчивости личинок селектированной линии к бактериям БТ.

Таким образом, было показано, что вместе с увеличением устойчивости происходит повышение активности ферментативных антиоксидантов (каталаза) и детоксикантов (ГСТ, эстеразы). Это может увеличивать защиту насекомых от АКМ при развитии бактериоза, особенно на начальных этапах инфекции. Кроме того, показано, что у насекомых десятого поколения, обладающих повышенной устойчивостью к бактериям, развитие окислительного дисбаланса в кишечнике при заражении БТ менее выражено, чем у насекомых контрольной линии.

### **3.3. Вклад неспецифических эстераз кишечника в формирование резистентности личинок *Galleria mellonella* к бактериальной инфекции *Bacillus thuringiensis***

Для изучения вклада неспецифических эстераз кишечника насекомых в устойчивость насекомых к бактериальной инфекции БТ мы проводили ингибирование активности ферментов в кишечнике и последующую оценку чувствительности насекомых к бактериям БТ. При однократном скармливании ингибитора неспецифических эстераз трифенилфосфата (ТФФ) личинкам *G. mellonella* и заражении насекомых бактериями БТ было показано достоверное увеличение ( $p < 0.05$ ) чувствительности насекомых к бактериям БТ (рис. 6А). В контроле и варианте со скармливанием только ингибитора гибель отсутствовала (рис. 6А). При этом необходимо отметить, что используемая доза ингибитора не приводила к снижению веса насекомых.

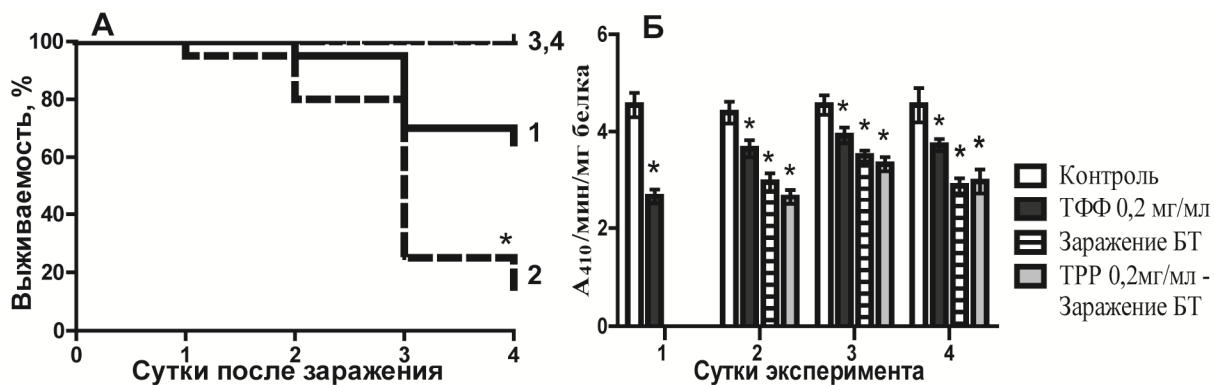


Рис. 6. (А) Чувствительность личинок *G. mellonella* к бактериям *B. thuringiensis* (БТ) (1 – насекомые, зараженные бактериями; 2 - насекомые, зараженные бактериями при предварительном скормливании ингибитора неспецифических эстераз; 3 – не зараженные насекомые (контроль); 4 – не зараженные насекомые при скормливании ингибитора) (n=200; \*\*p < 0.01 по сравнению с зараженными БТ насекомыми); (Б) Активность неспецифических эстераз кишечника у личинок *G. mellonella* при однократном скормливании ингибитора эстераз трифенилфосфата (ТФФ); при заражении бактериями *B. thuringiensis* (БТ); при скормливании ТРР и последующем заражении бактериями *B. thuringiensis* (БТ) (\*p ≤ 0.05 по сравнению с контролем).

Однократное скормливание ингибитора ТФФ с последующим заражением насекомых бактериями БТ не приводило к достоверно большому снижению активности фермента по сравнению со скормливанием только ингибитора или отдельным заражением бактериями (рис. 6Б). Кроме того, было показано, что при заражении личинок *G. mellonella* бактериями БТ также происходит снижение (p<0.05) активности неспецифических эстераз кишечника в течение трех дней развития инфекции (рис. 6Б).

Снижение активности неспецифических эстераз кишечника также было показано другими исследователями при скормливании насекомым протоксина БТ или при питании насекомых трансгенными растениями, синтезирующими активированный токсин БТ. Исследователи предполагают, что может происходить взаимодействие протоксина или активированного токсина с эстеразами, вследствие чего наблюдается снижение активности данного фермента (Gunning et al., 2005), но в тоже время может происходить инактивация токсина, что приведет к повышенной устойчивости насекомых к бактериям БТ.

Кроме того, нами было проведено сравнение двух внутривидовых форм личинок *G. mellonella*, отличающихся по географическому месту происхождения и интенсивности меланизации кутикулы. Обнаружено достоверное (p<0.05) отличие в выживаемости этих популяций личинок *G. mellonella* при заражении бактериями БТ.



Насекомые светлой окраски (европейская популяция) были достоверно ( $p < 0.05$ ) более устойчивы к бактериям БТ по сравнению с насекомыми темной окраски (западно-сибирская популяция). При изучении активности неспецифических эстераз кишечника у личинок двух внутривидовых форм показаны достоверные различия ( $p < 0.05$ ). Насекомые светлой окраски с более высоким уровнем активности неспецифических эстераз кишечника оказалась достоверно менее чувствительна к бактериям БТ ( $p < 0.01$ ).

Таким образом, проведенное нами сравнение активности эстераз у насекомых с повышенной устойчивостью к бактериям БТ, а также зарегистрированное увеличение чувствительности насекомых к бактериям БТ при ингибировании эстераз кишечника, свидетельствуют о значительном вкладе данных ферментов в механизмы резистентности насекомых к бактериям БТ. Полученные данные позволяют предположить, что неспецифические эстеразы, наряду с антиоксидантной системой могут выступать одними из важнейших механизмов, определяющих формирование устойчивости насекомых к бактериям БТ.

### **Заключение**

Популяции насекомых постоянно находятся под воздействием бактерий встречающихся в природе, а так же присутствующих в кишечнике интактных насекомых. Одними из широко распространенных бактерий являются представители группы *Bacillus thuringiensis/cereus*. Данные бактерии могут быть выделены из различных субстратов: почвы, воды, с поверхности листьев, непосредственно из растений, а так же из насекомых. Бактерии *Bacillus thuringiensis* (БТ) способны вызывать кишечные токсикозы, воздействующие в свою очередь на иммунитет и общее физиологическое состояние насекомых. Бактерии БТ в процессе вегетативного роста синтезируют различные токсины, действующие непосредственно на эпителиальные клетки кишечника насекомых, вызывая дисфункции и их лизис. В ходе эволюции у насекомых сформировались различные защитные механизмы, предотвращающие проникновение и развитие инфекции непосредственно в кишечнике (перитрофический матрикс, пищеварительные ферменты, регенерация эпителия), а также сформировалась мощная иммунная система, которая предотвращает развитие большинства микроорганизмов.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что проникновение бактерий в кишечник насекомых вызывает не только лизис эпителиальных клеток кишечника и нарушение процессов пищеварения (что было установлено ранее другими авторами), но и изменение активности антиоксидантных ферментов, а также соотношение неферментативных антиоксидантов. Кроме того происходит снижение активности ферментов детоксицирующей системы, в частности неспецифических эстераз. При этом возможно, происходит выброс в гемолимфу различных активаторов (медиаторов) иммунной системы, источником которых могут служить эпителиальные клетки кишечника. Данный процесс может происходить в первую очередь при вялотекущих инфекциях. Во время острого токсикоза, в гемолимфу также могут попадать компоненты разрушенных эпителиальных клеток и представители вульгарной микрофлоры. Под действием медиаторов, выделяемых эпителиальными клетками кишечника, компонентов разрушенного кишечника и проникших микроорганизмов происходит увеличение активности феноксидаз, реакций фагоцитоза и инкапсуляции в гемолимфе, а также антибактериальной активности в гемолимфе, жировом теле и кишечнике насекомых. Причем при остром бактериозе наряду с активацией гуморальных иммунных реакций, отмечено подавление клеточного звена иммунитета. Системная стимуляция иммунитета может происходить за счет мембранотропного действия токсинов БТ ( $\delta$ -эндотоксин, *Vip* токсины), у которых при активации образуются сайт-специфические компоненты, взаимодействующие непосредственно с рецепторами эпителиальных клеток, и запускающие процессы лизиса этих клеток. Подавление клеточных реакций иммунитета при острой инфекции, вероятно, связано с истощением пула гемоцитов, что может быть опосредовано их активным участием в репарационных процессах кишечника, а так же в изоляции проникающих в гемолимфу компонентов разрушенных клеток кишечника, бактерий и сопутствующей кишечной микрофлоры. Следует отметить, что острые инфекции крайне редко встречаются в природе, т.к. они могут приводить к быстрой элиминации, как хозяина, так и возбудителя инфекций из природной среды, что, в конечном счете, ведет к резкому сокращению численности, и в первую очередь высоковирулентных микроорганизмов. Однако, в природе насекомые, постоянно сталкиваются с бактериями, в том числе со слабовирулентными и авирулентными. Вполне закономерно, что данные бактерии могут

развиваться в кишечнике, и их токсины также будут активироваться. Однако при недостаточной дозе и низкой вирулентности будут возникать так называемые вялотекущие инфекции, которые не приводят к гибели насекомых, но при этом могут существенно влиять на активность, как иммунной, так и антиоксидантной и детоксицирующей систем кишечника. Это в свою очередь приведет к повышенной устойчивости насекомых к вторичным инфекциям различной природы, в том числе бактериальным. Подобные взаимодействия могут сопровождаться взаимовыгодным сосуществованием популяций насекомых и микроорганизмов.

При определенных условиях и постоянном контакте насекомых с бактериями БТ возможно формирование устойчивых популяций. Подобное взаимодействие, как мы уже отмечали выше, может происходить в природе при постоянном контакте с низкими дозами БТ. В условиях современного мира это может также происходить при применении биологических препаратов на основе БТ или при питании насекомых на трансгенных растениях, экспрессирующих гены токсинов БТ. В многочисленных исследованиях показано, что данная устойчивость обусловлена факторами, закрепленными генетически, и связана с мутациями сайтов связывания токсина (Rie et al., 1990; Oppert et al., 1994; Forcada et al., 1996; Bravo et al., 2005). Однако при селекции насекомых на устойчивость к бактериям БТ нами было показано, что на ранних этапах отбора (пятое-десятое поколение) повышение устойчивости к бактериям может происходить также вследствие повышенной активности антиоксидантной и детоксицирующей системы в кишечнике и синтеза антимикробных белков в жировом теле и кишечнике. Вероятно, увеличение активности данных систем позволяет насекомым эффективно инактивировать токсины, свободные радикалы и эндобиотики, образованные в собственных эпителиальных клетках при кишечных токсикозах, в том числе за счет локализации защитных реакций непосредственно в кишечнике, т.е. месте проникновения и развития инфекционного процесса. Комплексное действие антиоксидантной и детоксицирующей систем, а также систем иммунитета насекомых способно приводить к локализации повреждений кишечника, предотвращать действие токсина на эпителиальные клетки кишечника, защищать от вторичных инфекций, что, в конечном счете, приводит к выздоровлению насекомых.

Таким образом, системный иммунный ответ насекомых является одним из индуцибельных механизмов, обеспечивающих устойчивость

насекомых к бактериальным кишечным инфекциям. Вместе с тем наши исследования на устойчивых к БТ насекомых свидетельствуют, что локальное увеличение активности иммунного ответа, и повышение уровня антиоксидантной и детоксицирующей защиты кишечника также может играть важную роль в конституциональной защите против кишечной инфекции БТ.

## Выводы

1. Развитие сублетальной кишечной бактериальной инфекции *B. thuringiensis* приводит к активации клеточных и гуморальных реакций иммунитета личинок *G. mellonella*. При развитии острого бактериоза на фоне активации гуморальных реакций иммунитета происходит снижение активности клеточного иммунного ответа.

2. Селекция личинок *G. mellonella* на устойчивость к бактериям *B. thuringiensis* приводит к увеличению устойчивости насекомых на ранних этапах отбора (пятое-десятое поколение). У десятого поколения селектированных насекомых в кишечнике отмечено усиление базовой активности компонентов антиоксидантной и детоксицирующей систем (каталазы, глутатион-S-трансферазы и неспецифических эстераз). Кроме того в жировом теле и кишечнике насекомых селектированной линии регистрируется повышенный базовый уровень экспрессии антимикробных белков.

3. При развитии бактериоза *B. thuringiensis* у селектированных к бактериям личинок *G. mellonella* происходит индукция синтеза антимикробных белков, а также менее выраженное развитие окислительного дисбаланса в кишечнике, по сравнению с насекомыми контрольной линии.

4. Ингибирование неспецифических эстераз кишечника приводит к увеличению чувствительности личинок *G. mellonella* к бактериям *B. thuringiensis*. Показано, что личинки *G. mellonella*, более устойчивые к бактериям *B. thuringiensis*, обладают повышенной активностью неспецифических эстераз кишечника.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. Дубовский И.М., Гризанова Е.В., Боярищева Е.А., Исмаилов В.Я., Глупов В.В. Изучение протеиназ в кишечнике имаго клопа

вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae) различных поколений // Евразийский энтомологический журнал. 2006. Т.5. С.271-275.

2. Комаров Д.А., Слепнева И.А., Дубовский И.М., Гризанова Е.В., Храмцов В.В., Глупов В.В. Генерация супероксидного радикала и перекиси водорода в гемолимфе насекомых в процессе иммунного ответа // ДАН. 2006. Т.411. №3. Р. 420-423.

3. Крюкова Н.А., Дубовский И.М., Гризанова Е.В., Глупов В.В., Наумкина Е.А. Формирование клеточного иммунного ответа *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) при паразитировании *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) // Евразийский энтомологический журнал. 2007. V. 6(4). Р. 361-364.

4. Dubovskiy I.M., Martemyanov B.B., Vorontsova Y.L., Rantala M.J., Gryzanova E.V., Glupov V.V. Effect of the bacterial infection on the antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) // Comparative Biochemistry and Physiology. 2008. V. 148. P.1-5

5. Бахвалов С.А., Бахвалова В.Н., Крюкова Н.А., Гризанова Е.В., Наумкина Е.А., Шаталова Е.И. Изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) при питании на ранее дефолированной березе повислой (*Betula pendula* Roth). // Евразийский энтомологический журнал. 2008. V. 7(3). Р. 203-206.

6. Дубовский И.М., Гризанова Е.В., Черткова Е.А., Слепнева И.А., Комаров Д.А., Воронцова Я.Л., Глупов В.В. Генерация активированных кислородных метаболитов и активность антиоксидантов в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) при развитии процесса инкапсуляции // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2010. V. 46 (1). Р. 35-43.

7. Dubovskiy I.M., Grizanova E.V., Ershova N.S., Rantala M.J., Glupov V.V. The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* // Chemosphere. 2011. V. 85. P. 92–96.

### **Материалы конференций:**

8. Дубовский И.М., Гризанова Е.В., Черткова Е.А., Слепнева И.А., Комаров Д.А., Воронцова Я.Л., Глупов В.В. Участие активированных кислородных метаболитов и антиоксидантов в

реакции капсулообразования у личинок *Galleria mellonella* // Материалы V Всероссийского съезда паразитологического общества при российской академии наук «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения». СПб. 2008. Т.3. С. 245-246.

9. Гризанова Е.В., Дубовский И.М., Глупов В.В. Изучение показателей резистентности и жизнеспособности популяции *Galleria mellonella* при селекции на устойчивость к бактериям *Bacillus thuringiensis* // Материалы III межрегиональной научной конференции «Съезд паразитологов Сибири и Дальнего Востока, посвященная 80-летию профессора Константина Петровича Федорова». Новосибирск, 2009.

10. Гризанова Е.В., Дубовский И.М., Крюкова Н.А., Глупов В.В. Изучение реакций клеточного и гуморального иммунитета у личинок вощиной огневки *Galleria mellonella* в течение бактериальной инфекции *Bacillus thuringiensis* // Материалы международной научной конференции «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке». СПб: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2011. С. 182.

11. Гризанова Е.В., Дубовский И.М., Глупов В.В. Роль неспецифических эстераз кишечника в механизмах резистентности личинок *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) к бактериям *Bacillus thuringiensis* // Материалы XIV съезда русского энтомологического общества. Санкт-Петербург, 27 августа – 1 сентября 2012 г.