

На правах рукописи

ЧЕРТКОВА

Екатерина Анатольевна

**ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ДОФАМИНА ПРИ РАЗВИТИИ
ИНФЕКЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ, ВЫЗВАННЫХ
ЭНТОМОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ И ГРИБАМИ У
НАСЕКОМЫХ ОТРЯДОВ LEPIDOPTERA И COLEOPTERA**

03.02.05 – энтомология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук в лаборатории патологии насекомых.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Глунов Виктор Вячеславович

Официальные оппоненты: **Беньковская Галина Васильевна**
доктор биологических наук, доцент,
ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ
РАН, лаб. физиологической генетики,
ведущий научный сотрудник;

Алексеев Александр Анатольевич
кандидат биологических наук,
ФГБУН Институт химической кинетики и горения
им. В.В. Воеводского СО РАН, лаб. дисперсных
систем, старший научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Всероссийский научно-
исследовательский институт защиты растений»
(г. Санкт-Петербург, Пушкин)

Защита диссертации состоится 12 апреля 2016 г. в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии
животных СО РАН по адресу: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 11.
Факс: (383) 217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и
экологии животных СО РАН и на сайте института www.eco.nsc.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических
наук



Петрожицкая
Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Универсальным и эффективным способом защиты насекомых от воздействующих на них стрессирующих факторов является нейроэндокринная стресс-реакция, во время которой происходят существенные изменения уровней гормонов различной природы, таких как биогенные амины и гонадотропины (Rauschenbach et al., 1987; Груntenко, 2008). Одним из ключевых гормонов является биогенный амин – дофамин, который играет существенную роль в таких биологических процессах как формирование кутикулы, гонадотропная регуляция, энергетический метаболизм. Среди факторов, вызывающих стрессы особо стоит выделить различные инфекционные заболевания. Патогенные микроорганизмы могут вызывать эпизоотии как в естественных экосистемах, так и в агроценозах (Raymond et al., 2010; Augustyniuk–Kram, Kram, 2012; Sujeetha, Sahayaraj, 2014; Hasan, 2014). В силу того, что существует большое разнообразие энтомопатогенов, соответствующее воздействие на организм насекомого в зависимости от патогенного микроорганизма будет существенно отличаться. При инфекционном процессе происходят изменения многих физиологических реакций насекомых. В частности, в гемолимфе зараженных насекомых могут изменяться уровни гормонов стресса (Алексеев и др., 2007), выполняющих как нейрогормональные, так и иммуномодулирующие функции (Wu et al., 2015). Если учесть, что все реакции организма зависимы от гормонального статуса, то вполне закономерно, что уровни гормонов будут существенно влиять на иммунный статус организма насекомого, а также влиять на общий уровень резистентности к энтомопатогенам. Одним из наименее изученных нейрогормонов (при инфекционных процессах) остается дофамин. У насекомых дофамин является нейрогормоном, нейромедиатором и нейромодулятором. Кроме того, он участвует в формировании кутикулы (Noguchi et al., 1995; Kim et al., 2000; Theopold et al., 2004; Nappi, Christensen, 2005; Алексеев и др., 2008; Watanabe et al., 2013). Опосредованно дофамин влияет на синтез других гормонов (Jackson, Westlind-Danielsson, 1994; Yellman et al., 1997; Pendleton et al., 2002; Богомолова и др., 2009). Кроме того, дофамин задействован в поведенческих реакциях, репродуктивной и двигательной активности *Drosophila* (Neckameyer et al., 2000, 2001; Pendleton et al., 2000, 2002; Kume et al., 2005). Было показано, что различные экологические стрессоры (Rauschenbach et al., 1993; Hirashima et al., 2000; Rauschenbach et al., 2001; Neckameyer, Weinstein, 2005), а также инфекции различной природы способны приводить к повышению уровня дофамина (Noguchi et al., 1995; Алексеев и др., 2007). Также дофамин способен регулировать половое поведение насекомых (Brandes et al., 1990; Harris, Woodring, 1995; Sasaki, Nagaо, 2001; Harano et al., 2008). Показано, что дофамин способен влиять на интенсивность такой поведенческой реакции как груминг, который является одним из способов защиты насекомых от паразитов и патогенов (Libersat 2003; Libersat et al., 2009; Libersat, Gal, 2013, 2014; Currie, Stuart, 2001; Aubert, Richard, 2008; Zhukovskaya et al., 2013).

Важнейшим защитным механизмом насекомых против патогенов является профенолоксидазный (проФО) каскад, приводящий к образованию меланина (Christensen et al., 2005; Hiruma, Riddiford, 2009). При проникновении патогенов в организм насекомого происходит активация защитных механизмов, направленных на уничтожение патогенов, в частности проФО (Omelyanchuk et al., 2001; Dubovskiy et al., 2013a; Clark, 2015). Кроме того, было показано, что и на поверхности гемоцитов и внутри них есть дофадекарбоксилаза, главный фермент синтеза дофамина, а его метаболиты задействованы в процессах фагоцитоза, меланизации и инкапсуляции (Sideri et al., 2007; Marmaras, Lampropoulou, 2009). Дофамин является неотъемлемой частью проФО каскада, в процессе которого образуются меланотические тромбы, являющиеся характерной чертой течения микозов, а также образующиеся в результате механических повреждений покровов насекомого (Hajek, Leger, 1994; Tang, 2009; Andersen, 2010). Кроме того, при воздействии других энтомопатогенных микроорганизмов, таких как бактерии *Bacillus thuringiensis*, обладающих кишечной токсичностью (Bravo et al., 2011), происходит повышение активности фагоцитоза, инкапсуляции (Dubovskiy et al., 2008), фенолоксидаз гемолимфы насекомых (Rahman et al., 2004).

Таким образом, можно сказать, что дофамин является одним из важнейших соединений, участвующих в реализации комплекса защитных реакций на действие стресс-факторов. Дофамин принимает участие как в изменении поведенческих, так и физиологических реакций при влиянии различных стресс-факторов, однако практически не изучена его роль при развитии инфекционных заболеваний насекомых. Неизвестно какой вклад вносит дофамин в функционирование меланотического каскада при стрессовых воздействиях, таких как инфекционная нагрузка. Отсутствуют сведения о его участии в процессе инкапсуляции у насекомых. Практически не изучено, какую роль он играет при острых микозах и кишечных бактериозах.

Степень разработанности темы. Следует отметить, что по данным направлениям исследований существует большое количество работ, посвященных детальному изучению влияния различных стрессоров на уровень гормонов и иммунный ответ организма насекомого, однако работы, в которых рассматривается влияние инфекционных агентов на гормональный уровень насекомых, единичны (Алексеев и др., 2007; Kong et al., 2013). В первую очередь это касается влияния различных бактериозов и микозов на уровень гормонов стресса, в том числе биогенных аминов, таких как дофамин. В связи с этим наша работа посвящена изучению динамики уровня таких биогенных аминов как дофамин при различных патогенезах и под влиянием абиотических факторов у представителей отрядов Lepidoptera и Coleoptera.

Цель: оценить изменение уровня дофамина при развитии стресс-реакции и формировании иммунного ответа у большой вошинной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), капустной совки *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*

(Coleoptera: Chrysomelidae) при бактериальных и грибных инфекциях, а также действию инсектицидов и абиотических факторов.

Для достижения цели нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить уровень дофамина у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при заражении сублетальными и полублетальными дозами бактерий *Bacillus thuringiensis*

2. Определить уровень дофамина и активность фенолоксидаз при развитии микозов, вызванных грибами *Metarhizium robertsii* и *Beauveria bassiana* у личинок вошинной огневки, колорадского жука и капустной совки.

3. Определить уровень дофамина и активность фенолоксидаз при развитии смешанных инфекций, вызванных *Metarhizium robertsii* и *Bacillus thuringiensis*, а также при совместной обработке фосфорорганическим инсектицидом пиримифос-метилом и грибом *Metarhizium robertsii* у личинок колорадского жука.

4. Проанализировать взаимосвязь между уровнем дофамина и интенсивностью инкапсуляции у личинок *Galleria mellonella*.

5. Определить уровень дофамина у личинок вошинной огневки *Galleria mellonella* и капустной совки *Mamestra brassicae* при воздействии стрессоров абиотической природы (повышенные и пониженные температуры, механические повреждения).

Научная новизна. Впервые показано повышение уровня дофамина у капустной совки *Mamestra brassicae* и вошинной огневки *Galleria mellonella* при воздействии стресс-факторов абиотической природы (температура, механические повреждения). Впервые выявлено, что заражение личинок большой вошинной огневки *Galleria mellonella* бактериями *Bacillus thuringiensis*, колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* и капустной совки *Mamestra brassicae* энтомопатогенными грибами *Metarhizium robertsii* и *Beauveria bassiana* приводит к увеличению уровня дофамина. Кроме того, обнаружено, что степень повышения уровня дофамина зависит от вирулентных свойств энтомопатогенного микроорганизма.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов стресс-реакции у насекомых при воздействии стресс-факторов различной природы. Кроме того, данные по уровню гормонов стресса могут помочь при мониторинге состояния популяций насекомых, в том числе насекомых - вредителей сельского хозяйства, так как дофамин является своеобразным маркером стресса в популяциях насекомых.

Положения, выносимые на защиту.

Энтомопатогенные микроорганизмы (грибы и бактерии) являются биотическими стресс-факторами для организма насекомого и вызывают резкие

изменения уровня дофамина. Характер изменения уровня дофамина при воздействии энтомопатогенных микроорганизмов на насекомых аналогичен изменениям, наблюдающимся при воздействии абиотических факторов (температуры, механических повреждений покровов).

Степень достоверности результатов. Для определения достоверности результатов работы использованы современные методы подготовки образцов и анализа изучаемых параметров у насекомых. Методическая база, использованная для проведения исследований, соответствует поставленным задачам. Для статистической обработки полученного материала применены корректные статистические методы анализа. Методы, использованные для проведения исследований адекватны поставленным нами задачам.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на V Межрегиональной конференции "Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке" (Новосибирск, 2015), съезде Королевского энтомологического общества «Иммунитет насекомых» (Великобритания: Шеффилд, 2009), семинарах лаборатории патологии насекомых (ИСиЭЖ СО РАН, Новосибирск, 2014, 2015 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объём диссертации. Текст диссертации изложен на 127 страницах, из которых 91 страницу занимает основная часть, работа иллюстрирована 27 рисунками. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы. Список литературы содержит 278 источников, в том числе 252 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н., профессору В.В. Глупову за руководство научной работой, поддержку и помощь при написании диссертации; к.б.н. И.М. Дубовскому за помощь при обсуждении результатов, поддержку на всех этапах работы; к.б.н. Н.А. Крюковой и д.б.н. В.Ю. Крюкову за ценные замечания при работе с рукописью диссертации. За помощь в проведении экспериментальной работы автор искренне признателен к.б.н. О.Н. Ярославцевой, к.б.н. Е.В. Гризановой и другим сотрудникам лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой главе рассматриваются особенности систем организма насекомого, которые являются мишенями для агентов биологической и химической природы, в частности это: внешние покровы насекомых, нейроэндокринная, пищеварительная, иммунная системы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на трех видах насекомых: большой пчелиной огневке *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera:Pyralidae), капустной совке *Mamestra*

brassicae L. (Lepidoptera: Noctuidae), колорадском жуке *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae).

Личинки большой вошинной огневки были взяты из лабораторной популяции ИСИЭЖ СО РАН. Личинки колорадского жука были собраны в Новосибирской области на полях, свободных от обработок инсектицидными препаратами. Яйца капустной совки были собраны на полях капусты белокочанной ООО СХП «Агрос». В работе использовались личинки II поколения капустной совки, полученные в лабораторных условиях.

Для заражения использовали бактерии *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* (H8 ab) Bonnifoi and de Barjak var. *tenebrionis* Krieg et al., (штамм 2495) из коллекции микроорганизмов ИСиЭЖ СО РАН и штаммы энтомопатогенных грибов *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber из коллекции ИСиЭЖ СО РАН (штамм Р-72) и Всероссийского института защиты растений РАСХН (штамм МАК-1) и *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. штамм САР-31. Для обработки насекомых использовали действующее вещество (д.в.) пиримифос-метил, относящееся к группе фосфорорганических инсектицидов (ФОС).

Заражение бактериями *B. thuringiensis* проводили перорально, а конидиями грибов *B. bassiana* и *M. robertsii* – перкутанно. Обработку насекомых инсектицидом проводили топикально. Совместное заражение насекомых энтомопатогенными бактериями и грибами проводили на личинках колорадского жука *L. decemlineata* по вышеуказанным методикам. В варианте с совместным заражением и энтомопатогенными грибами и бактериями сначала проводили обработку личинок энтомопатогенным грибом *M. robertsii* шт. Р-72, а затем подсаживали их на корм, обработанный энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis* штамм 2495. Обработку насекомых инсектицидом проводили топикально. Совместное воздействие пиримифос-метила и энтомопатогенного гриба *M. robertsii* осуществляли по вышеуказанным методикам с интервалом в 12 часов. Для моделирования стресса, вызванного абиотическими факторами нами были использованы 3 модели воздействия на насекомых: перегрев (50°C 2 минуты), переохлаждение (-18°C 5 минут), ожог (прикосновение раскаленной иглой). Данные модели применялись к личинкам вошинной огневки *G. mellonella* и капустной совки *M. brassicae*. Через 10 минут после воздействия абиотическими стрессорами производили забор гемолимфы для приготовления образцов для измерения дофамина. Интенсивность процессов инкапсуляции, фенолоксидазную активность гемолимфы, определяли по общепризнанным методикам с модификациями (Дубовский и др., 2011, Dubovskiy et al., 2011, 2013).

Содержание дофамина (ДА) в гемолимфе измеряли методом внешнего стандарта на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity с электрохимическим детектором EsaCoulchemIII (модель ячейки 5010A; потенциал ячейки 300mV) по методу Груntenко с соавторами (Gruntenko et al., 2005) с модификациями. В качестве стандарта использовали

Dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich). Разделение проводили на колонке ZorbaxSB-C18 (4,6мм ×250 мм, частицы 5 мкм) в изократическом режиме. Подвижная фаза: 90% буфера (200 мг/л 1-OctaneSulfonicAcid (Sigma-Aldrich), 3,5 г/л KH_2PO_4) и 10% ацетонитрила. Скорость потока 1 мл/мин. Обработка хроматограммы проводилась с помощью ПО ChemStation, количество дофамина определяли сравнением площадей пиков стандарта и образца.

Данные представлены как среднее арифметическое и его ошибка. Данные были проверены на нормальность распределения при помощи теста Д'Агостино (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) и критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk normality test). Для данных с нормальным распределением использовали Т-Тест, а также однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ с post-hoc тестом Бонферрони (one-way, two-way ANOVA, Bonferroni's test). Статистическую значимость различий изучаемых параметров для данных с ненормальным распределением определяли с помощью теста Мана-Уитни (Mann–Whitney U-test) и однофакторного дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана (Kruskal-Wallis test with Dunn's test). Сравнение динамики смертности насекомых при заражении энтомопатогенными бактериями и грибами и обработке инсектицидами проводили с использованием метода Каплана Майера с последующим Log-Rank тестом. Для анализа использованы программы Statistica 6.0, GraphPad Prism v.4.0. (GraphPad Software, USA), Sigma Stat 3.1.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Воздействие абиотических стресс-факторов на уровень дофамина в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* и *Mamestra brassicae*

Для моделирования абиотического стресса мы использовали три вида воздействия: перегрев, переохлаждение, ожог. Было показано, что при перегреве уровни ДА повышаются примерно в 7 и 3,5 раза у личинок капустной совки *M. brassicae* и вошинной огневки *G. mellonella* соответственно (различия достоверны рис. 1 А., Б.) У капустной совки отмечено достоверное увеличение уровня дофамина в гемолимфе по отношению к контролю в варианте с ожогом в 5,5 раз (рис. 1 Б.). При воздействии пониженной температуры уровень ДА не изменялся.

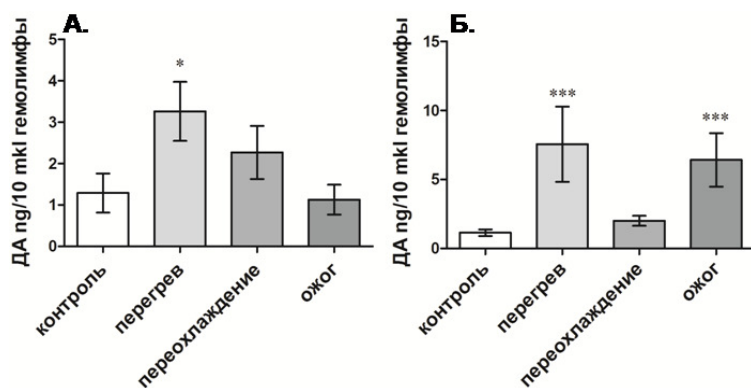


Рис. 1. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *G. mellonella* (А) и *M. brassicae* (Б) при воздействии абиотических стресс-факторов; * $p < 0.05$ по сравнению с контролем; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем; $n = 50$ и 15 на вариант соответственно.

Аналогичные результаты были получены другими исследователями (Hirashima et al., 2000; Rauschenbach et al., 1993; Chentsova et al., 2002). Отсутствие повышения уровня дофамина при воздействии на насекомых отрицательных температур, вероятно, связано с замедлением всех метаболических процессов у насекомых, подвергшихся этому воздействию. При таком воздействии дофамин может выполнять несколько функций - с одной стороны, он секретируется в гемолимфу личинок как нейрогормон, с другой стороны, при механическом повреждении покровов (в данном случае это ожог) происходит формирование меланотического пятна в месте ожога, а, как известно, дофамин является важным звеном меланогенеза.

3.2. Уровень дофамина и активность фенолоксидаз в гемолимфе *Galleria mellonella* при инкапсуляции

Интенсивность меланизации нейлонового имплантата у личинок *G. mellonella* достоверно ($p < 0.001$) увеличивалась в пределах 4 часов. В дальнейшем она не изменялась (рис.2).

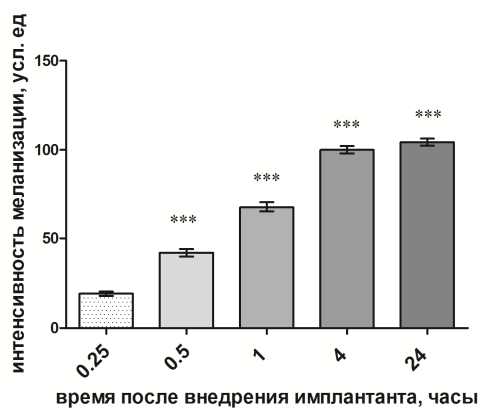


Рис. 2. Интенсивность меланизации нейлонового имплантата у личинок *G. mellonella*; *** $p < 0.001$ по сравнению с вариантом 15 мин; $n = 50$ на вариант.

Активность фенолоксидаз в гемолимфе при инкапсуляции достоверно ($p < 0.001$) отличалась от контроля в 2,5 раза через 4 часа после внедрения имплантата.

Уровень дофамина при введении нейлонового имплантата у личинок *G. mellonella* достоверно ($p < 0.001$) повышался по отношению к контролю через 24 часа после внедрения (рис. 3).

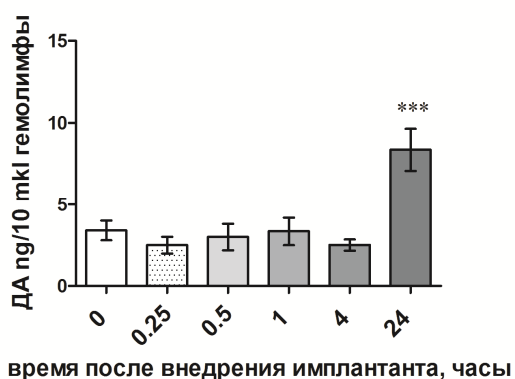


Рис. 3. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *G. mellonella* при введении нейлонового имплантата; *** $p < 0.001$ по сравнению с другими вариантами; $n = 50$ на вариант.

В период активного формирования меланотической капсулы (0.25 - 4 часа) мы регистрировали достоверное увеличение активности фенолоксидаз гемолимфы личинок *G. mellonella*, но концентрация ДА в гемолимфе в этот период оставалась на уровне контроля (рис. 3). В данном случае повышение активности фенолоксидаз гемолимфы связано с запуском меланотического каскада, так как этот фермент является ключевым в этом процессе (Ling, Yu, 2005; Dubovskiy et al., 2010; Kryukova et al., 2011). ДА также является непосредственным участником меланотического каскада (Noguchi et al., 1995; Алексеев и др., 2008; Theopold et al., 2004; Nappi, Christensen, 2005;

Watanabe et al., 2013; Kim et al., 2000), но его концентрация в гемолимфе при инкапсуляции вплоть до 24 часов остается на уровне контроля (рис. 3). Однако через 24 часа после введения имплантата концентрация ДА резко и достоверно увеличивается. Возможно, данный феномен связан с характером повреждения насекомых. Внедрение инертного объекта, вероятно, не является настолько сильным стрессирующим фактором, чтобы запустить гормональный ответ. Это связано с тем, что в месте проникновения имплантата и ранения, происходит запуск комплекса клеточных и гуморальных реакций, позволяющий быстро локализовать иммунный ответ (Dubovskiy et al., 2010). Можно предположить, что накопление ДА в гемолимфе к 24 часам после внедрения имплантата (рис. 3) связано с подготовкой насекомого к возможному возникновению вторичной инфекции, которая может последовать за асептическим ранением. Данный феномен нуждается в дополнительном изучении.

3.3. Влияние грибной инфекции на уровень дофамина насекомых

3.3.1. Уровень дофамина в гемолимфе *Galleria mellonella* при заражении энтомопатогенным грибом *Beauveria bassiana*

При заражении *G. mellonella* энтомопатогенным грибом *B. bassiana* LT_{50} при использовании титра 10^6 конидий/мл составляла 11 ± 1.1 дней, а при использовании титра 10^8 конидий/мл LT_{50} 9 ± 0.793 дней ($\chi^2=7.119$, $P=0.05$).

Кроме того, мы регистрировали дозозависимое увеличение концентрации ДА. Тенденции к повышению уровня ДА регистрировались, начиная с 3-х суток эксперимента, а на 5 сутки концентрация ДА достоверно повышалась как в варианте с применением титра 10^6 , так и в варианте с применением концентрации 10^8 конидий/мл (рис. 4).

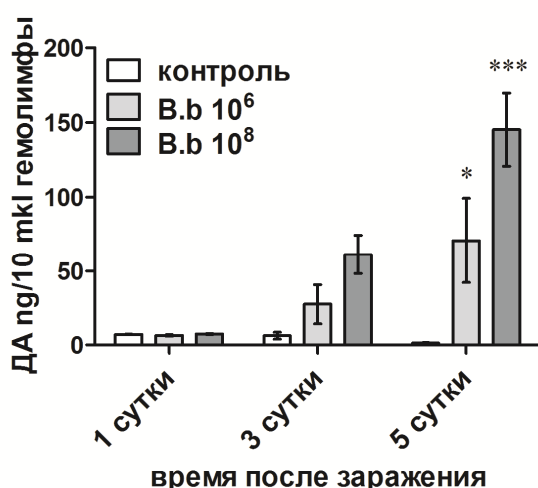


Рис. 4. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *G. mellonella* при заражении *B. bassiana* (*B.b*); * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем на те же сутки; $n=50$ на вариант.

3.3.2. Уровень дофамина в гемолимфе *Mamestra brassicae* при микозе, вызванном энтомопатогенным грибом *Beauveria bassiana*

Смертность личинок капустной совки через 9 суток после заражения энтомопатогенным грибом *B. bassiana* достигала 40 и 65% в вариантах с использованием титра конидий 10^5 и 10^8 соответственно ($\chi^2=4.158$; $P=0.05$). При

заражении личинок *M. brassicae* энтомопатогенным грибом *B. bassiana* было отмечено достоверное увеличение концентрации дофамина в гемолимфе насекомых на третьи сутки эксперимента в 4 раза по сравнению с контролем в варианте с использованием титра конидий 10^8 конидий/мл (рис. 5).

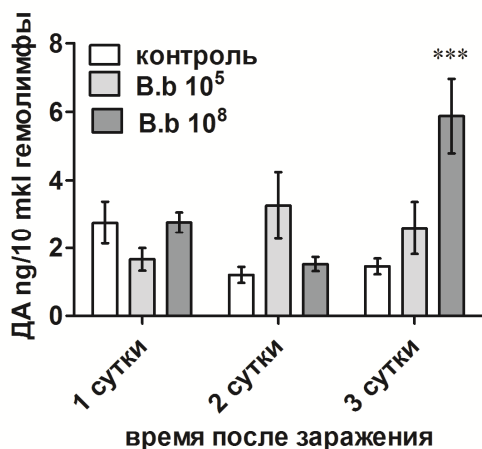


Рис. 5. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *M. brassicae* при заражении *B. bassiana* (B.b); *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем на те же сутки; $n = 15$ на вариант.

3.3.3. Уровень дофамина в гемолимфе *Mamestra brassicae* при микозе, вызванном энтомопатогенным грибом *Metarhizium robertsii*

Смертность личинок капустной совки в варианте с использованием титра *M. robertsii* 10^8 конидий/мл была выше, чем в варианте с использованием титра 10^5 конидий/мл ($\chi^2 = 3.228$; $P = 0.05$). При заражении личинок капустной совки титром 10^8 конидий/мл LT_{50} составило 16 ± 1.76 дней, а при заражении титром 10^5 конидий/мл LT_{50} составило 23 дня.

В варианте с заражением капустной совки *M. brassicae* грибом *M. robertsii* достоверных отличий в уровне дофамина отмечено не было. Однако нами была отмечена та же тенденция, что и в предыдущих экспериментах, а именно - повышение уровня ДА наблюдалось на 2 и 3 сутки после заражения и зависело от дозы патогена.

3.3.4. Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при микозе, вызванном разными штаммами гриба *Metarhizium robertsii*

При заражении личинок *L. decemlineata* токсигенным штаммом P-72 энтомопатогенного гриба *M. robertsii* гибель личинок происходила значительно раньше, чем при заражении биотрофным штаммом. LT_{50} при заражении токсигенным штаммом составило 4 ± 0.52 дня, а при заражении биотрофным штаммом - 9 ± 0.37 дней ($\chi^2 = 24$; $P = 0.025$) (рис. 6).

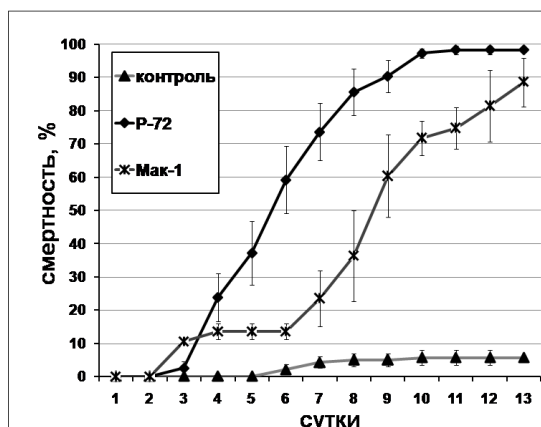


Рис. 6. Динамика смертности личинок *L. decemlineata* при заражении разными

штаммами гриба *M. robertsii* (M.r): P-72 - токсигенный штамм, Мак-1 – биотрофный штамм.

При заражении колорадского жука энтомопатогенным грибом *M. robertsii* с разным типом патогенеза (токсигенный штамм P-72 и биотрофный штамм Мак-1) было отмечено достоверное увеличение концентрации ДА на 3 сутки эксперимента по сравнению с контролем. Кроме того, достоверными оказались различия между биотрофным штаммом (Мак-1) и токсигенным штаммом P-72. Концентрация дофамина при заражении биотрофным штаммом была достоверно ниже, чем при заражении токсигенным штаммом в 2,5 раза (рис. 7).

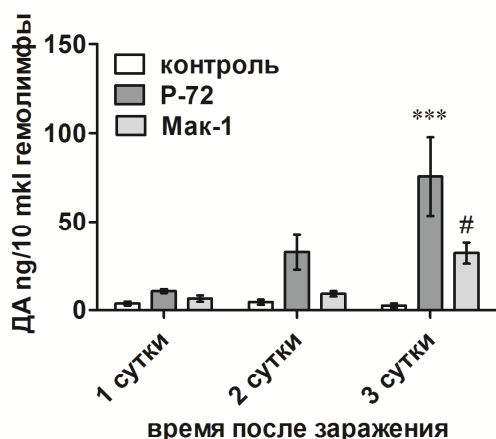


Рис. 7. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *L. decemlineata* при заражении разными штаммами гриба *M. robertsii*; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем на те же сутки; # $p < 0.01$ по сравнению с токсигенным штаммом *M. robertsii* P-72 на те же сутки; $n = 30$ на вариант.

На фоне повышения концентрации дофамина в гемолимфе происходило достоверное увеличение фенолоксидазной активности на 2 сутки после заражения токсигенным штаммом *M. robertsii* P-72 по сравнению с контролем. На третьи сутки после заражения биотрофным штаммом МАК-1 было отмечено достоверное повышение фенолоксидазной активности гемолимфы личинок колорадского жука по сравнению с контролем.

Отмеченное нами увеличение концентрации ДА при заражении личинок *G. mellonella* и *M. brassicae* энтомопатогенными грибами *B. bassiana* и *M. robertsii* может быть связано не только с выбросом данного вещества в качестве нейрогормона при общем стрессировании организма, но и с непосредственным участием ДА в меланогенезе, который является важнейшим средством защиты организма насекомого от патогенов, проникающих через кутикулу (Dubovskiy et al., 2013).

При заражении колорадского жука *L. decemlineata* штаммами энтомопатогенного гриба *M. robertsii* с разным типом патогенеза мы регистрировали повышение уровня ДА в варианте с обоими штаммами на третьи сутки после заражения. По нашему мнению, существенное различие в концентрации ДА у насекомых при заражении разными штаммами гриба *M. robertsii* скорее всего связано с особенностями течения микозов, характерных для данных штаммов (Крюков и др., 2011). Также мы регистрировали достоверное увеличение активности фенолоксидаз гемолимфы колорадского жука на вторые и третьи сутки после заражения (на вторые сутки мы наблюдали повышение активности фенолоксидаз гемолимфы насекомых в варианте с заражением токсигенным штаммом P-72, а на третьи сутки тот же эффект мы наблюдали в варианте с заражением биотрофным штаммом Мак-1).

Вероятнее всего, такие отличия также связаны с особенностями течения микозов и вирулентных свойств каждого штамма (Крюков и др., 2011). Отмеченное нами увеличение активности фенолоксидаз в гемолимфе личинок *L. decemlineata* при развитии микоза согласуется с результатами работ других авторов (Gillespie, Khachatourians, 1992; Hung, Boucias, 1996; Dubovskiy et al., 2013; Kryukov et al., 2014; Kryukov et al., 2015).

3.4. Влияние бактериальной и смешанной бактериально-грибной инфекции на уровень дофамина насекомых

3.4.1. Уровень дофамина у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при бактериозе, вызванном бактериями *Bacillus thuringiensis*

При заражении личинок *L. decemlineata* энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* гибель насекомых при использовании титра бактерий 2×10^9 спор и кристаллов/мл была выше, чем при заражении насекомых более низким титром бактерий 5×10^8 спор и кристаллов/мл ($\chi^2=31.41$; $P=0.025$).

Нами было отмечено достоверное увеличение уровня ДА на 2-е и 3-и сутки после заражения как в варианте с применением титра бактерий 5×10^8 , так и в варианте с использованием титра 2×10^9 спор и кристаллов/мл (рис.9).

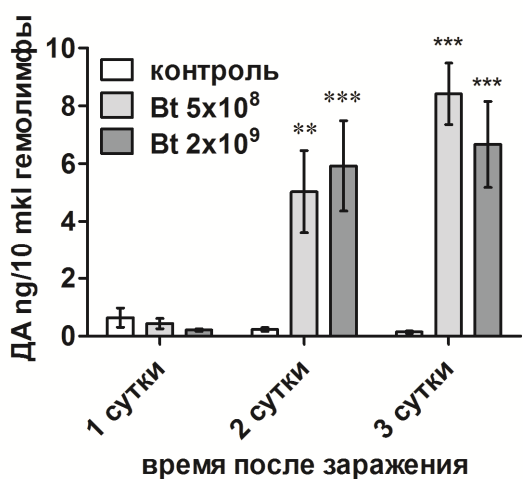


Рис. 9. Уровень дофамина в гемолимфе личинок *L. decemlineata* при заражении бактериями *B. thuringiensis*; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем на те же сутки; $n=30$ на вариант.

3.4.2. Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при развитии смешанной инфекции, вызванной энтомопатогенным грибом *Metarhizium robertsii* и бактериями *Bacillus thuringiensis*

В результате совместного заражения грибом и бактериями наблюдался синергизм в смертности личинок колорадского жука. Гибель насекомых в варианте с совместным применением гриба и бактерий наступала раньше, чем в других вариантах ($LT_{50}=2 \pm 0.114$ дня) (рис. 10). Гибель личинок *L. decemlineata* при заражении бактериями *B. thuringiensis* недостоверно отличалась от контроля (рис. 10), что связано с использованием низкого ($2,5 \times 10^7$ спор и кристаллов/мл) титра бактерий *B. thuringiensis*. При грибном монозаражении LT_{50} составляло 8 ± 0.267 дней.

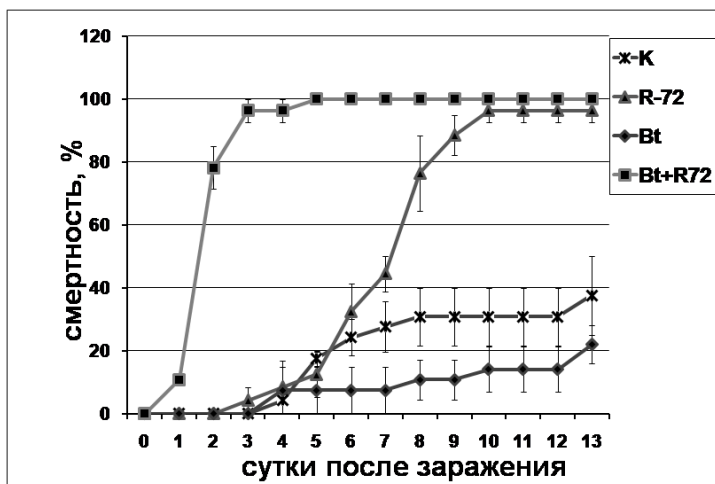


Рис. 10. Динамика смертности личинок *L. decemlineata* при развитии микс-инфекции, вызванной энтомопатогенными грибом *M. robertsii* (R-72) и бактериями *B. thuringiensis* (Bt)

Таким образом, мы можем говорить о синергическом эффекте в смертности насекомых при совместном использовании гриба *M. robertsii* и бактерий *B.*

thuringiensis по сравнению с бактериальным ($\chi^2=58.6$; $P=0.008$) и грибным ($\chi^2=52.9$; $P=0.01$) монозаражением.

При совместном заражении личинок бактериями и грибами было показано достоверное увеличение уровня дофамина при грибной моноинфекции на 2 и 3 сутки эксперимента. Тенденция к увеличению уровня дофамина наблюдалась на 3 сутки после заражения энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis*. В остальных вариантах эксперимента достоверных отличий в уровнях дофамина отмечено не было (рис.11).

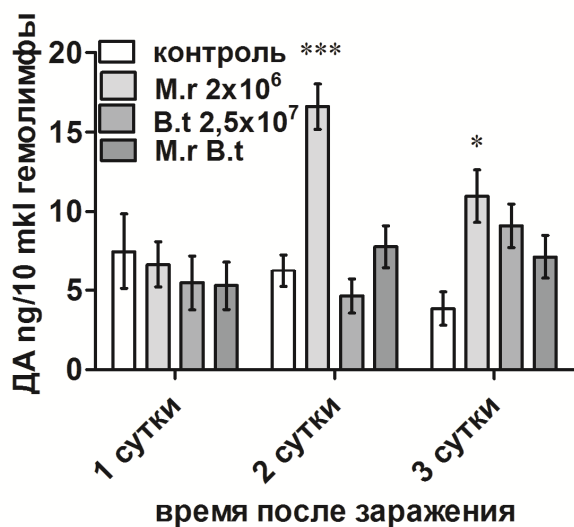


Рис. 11. Уровень дофамина у личинок *L. decemlineata* при развитии смешанной инфекции, вызванной энтомопатогенными грибом *M. robertsii* и бактериями *B. thuringiensis*; *** $p<0.001$ по сравнению с контролем на те же сутки; * $p<0.05$ по сравнению с контролем на те же сутки; $n=45$ на вариант;

При этом на 3 сутки эксперимента было отмечено достоверное повышение активности феноксидаз гемолимфы в варианте с бактериальной моноинфекцией по сравнению с контролем.

Отмеченное нами повышение концентрации ДА (рис. 9) в гемолимфе колорадского жука при развитии бактериальной инфекции свидетельствует о развитии неспецифической стресс-реакции организма насекомого, возникающей в ответ на воздействие бактерий *B. thuringiensis*. Это связано с действием Cry токсина (Hilbeck, Schmidt, 2006; Portugal et al., 2014; Adang et al., 2014). Вследствие проникновения и развития инфекции активируются клеточный и гуморальный иммунные ответы организма насекомого (Grizanova et al., 2014). Так, было показано увеличение активности фагоцитоза и инкапсуляции (Dubovskiy et al., 2008) и активности феноксидаз гемолимфы (Rahman et al., 2004; Grizanova et al., 2014) насекомых при бактериальной

инфекции, вызванной *B. thuringiensis*. Исходя из вышеизложенного, можно сказать, что повышение концентрации ДА может быть связано с активацией профенолоксидазного каскада при бактериозе. До конца не понятен вклад ДА в защитные реакции против бактерий, но можно предположить, что повышение его уровня происходит в ответ на воздействие таких стресс-факторов как токсины бактерий или как часть генерализованной стресс-реакции.

Полученный нами синергический эффект в смертности колорадского жука при совместном заражении энтомопатогенными грибом *M. robertsii* и бактериями *B. thuringiensis* согласуется с результатами опытов по одновременной обработке грибными и бактериальными энтомопатогенами и биопестицидами на их основе (Wraight, Ramos, 2005; Крюков и др., 2009). При бактериальном монозаражении смертность личинок не отличалась от контроля (рис. 10), что объясняется использованием низкого ($2,5 \times 10^7$ спор и кристаллов/мл) титра бактерий *B. thuringiensis*. Но, несмотря на низкую гибель насекомых, это может приводить к изменению ряда параметров физиологических систем: у насекомых, зараженных бактериями, происходило ухудшение питания, замедление роста, снижение веса. В свою очередь все эти факторы могут благоприятно действовать на проникновение и развитие гриба в гемоцеле насекомого, что вызывает эффект синергизма в смертности насекомых в варианте со смешанным бактериально-грибным заражением (рис. 10).

Кроме того, мы регистрировали достоверное ($p < 0.001$) увеличение уровня ДА при грибной моноинфекции на 2 и 3 сутки эксперимента (рис. 11). Тенденция к увеличению уровня ДА наблюдалась на 3 сутки после заражения энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis*. В остальных вариантах эксперимента достоверных отличий в концентрации ДА отмечено не было, что, скорее всего, связано с сильнейшей интоксикацией организма насекомого и высокой смертностью насекомых при совместном бактериально-грибном заражении (рис. 10).

3.5. Уровень дофамина и активность фенолоксидаз у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при совместном воздействии энтомопатогенного гриба *Metarhizium robertsii* и пиримифос-метила

Как известно, под контролем нейроэндокринной системы находятся жизненно важные системы организма насекомого, в том числе иммунная система (Dubovskiy et al., 2013). В связи с этим, воздействие на сложный нейроэндокринный комплекс, так или иначе, должно сказаться на иммунных реакциях и синтезе нейрогормонов насекомых. Нами были проведены опыты по совместной асинхронной обработке личинок колорадского жука грибами *M. robertsii* и фосфорорганическим инсектицидом пиримифос-метилом (ПМФМ).

Предварительная обработка сублетальными дозами ПМФМ снижает чувствительность насекомых к грибам (ПМФМ+Mr), в то время как обработка ПМФМ после заражения грибом приводит к увеличению смертности от

патогена (Mr+ПМФМ). Так, гибель в варианте Mr+ПМФМ наступает раньше ($LT_{50}=8\pm 0.28$ дней), чем в варианте ПМФМ+Mr ($LT_{50}=9\pm 0.38$ дней) (рис. 12).

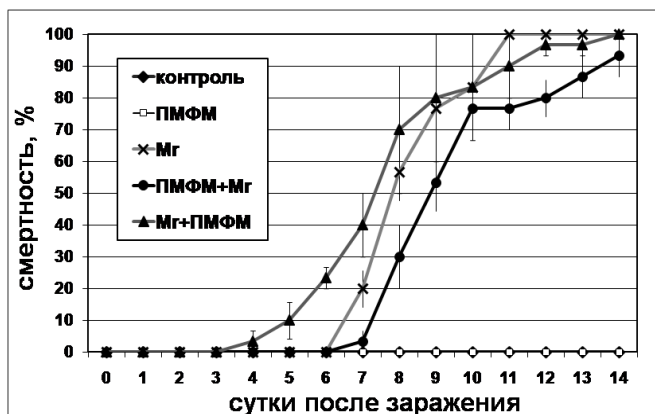


Рис. 12. Динамика смертности личинок *L. decemlineata* при совместном воздействии энтомопатогенного гриба *M. robertsii* (Mr) и пиримифос-метила (ПМФМ)

При совместной асинхронной обработке личинок колорадского жука грибом *M. robertsii* (Mr) и фосфорорганическим инсектицидом пиримифос-метилом (ПМФМ) было

показано, что концентрация ДА при заражении грибом достоверно увеличивалась через 12 часов после воздействия (рис. 13). Кроме того, через 12 часов после обработки инсектицидом у насекомых регистрировали достоверное снижение уровня ДА по сравнению с контролем (рис. 13).

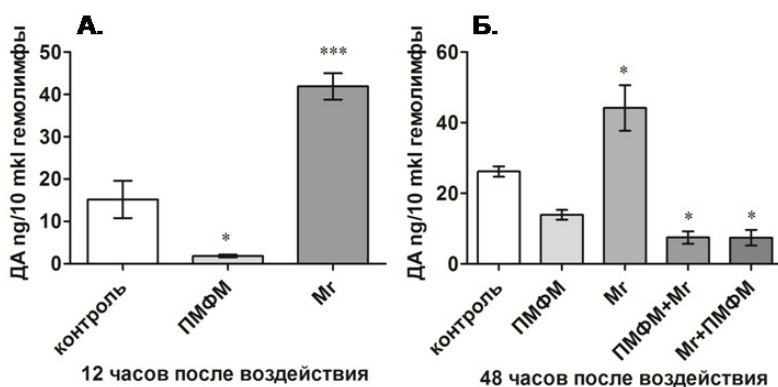


Рис. 13. Уровень дофамина у личинок *L. decemlineata* при совместном воздействии энтомопатогенного гриба *M. robertsii* (Mr) и пиримифос-метила (ПМФМ) через 12 часов (А) и через 48 часов (Б) после воздействия; *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ по сравнению с контролем; $n=15$ на вариант.

сравнению с контролем; $n=15$ на вариант.

При совместном воздействии энтомопатогенного гриба *M. robertsii* и пиримифос-метила (ПМФМ) мы наблюдали синергизм в смертности насекомых по сравнению с грибным монозаражением и воздействием сублетальными концентрациями чистого инсектицида. Подобный эффект наблюдался только в одном случае - при заражении грибом с последующей обработкой насекомых ПМФМ. Полученные нами данные полностью согласуются с результатами других авторов, которые регистрировали эффект синергизма при совместном применении энтомопатогенного гриба *M. anisopliae* и инсектицида на основе пиримифос-метила против колорадского жука (Dubovskiy et al., 2010). Сходные результаты были получены при совместном применении токсинов энтомопатогенных грибов *Metarhizium* и *Beauveria* и хлорорганических соединений, ФОС и неоникотиноидов против медведицы *Spilargia obliqua* (Purwar, Sachan, 2006).

Повышение уровня ДА мы фиксировали только в варианте с грибным монозаражением, а самое интенсивное снижение уровня ДА наблюдалось при совместном применении гриба и инсектицида и при применении чистого инсектицида. Реакция организма насекомого на химическое отравление

оказалась отличной от реакции на другие типы стрессирующих воздействий. Скорее всего, подобное явление связано с особенностями воздействия пиримифос-метила. Вследствие того, что мишенью данного инсектицида является ацетилхолинэстераза и его воздействие приводит к нарушению функционирования нервной системы (Pore, 1999), можно предположить, что при этом нарушается и выброс нейрогормонов и нейромедиаторов, в том числе и ДА. Вероятно, этот эффект мы и наблюдаем при заражении насекомых вышеупомянутым инсектицидом

Достоверных отличий по активности фенолоксидаз в гемолимфе личинок колорадского жука при асинхронной обработке насекомых энтомопатогенным грибом *M. robertsii* (Mr) и инсектицидом пиримифос-метилом (ПМФМ) нами не было зарегистрировано.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Любой инфекционный процесс независимо от возбудителя является сложным явлением, затрагивающим многие физиологические системы организма хозяина. В первую очередь, происходит нарушение нормального функционирования жизненно важных систем организма. Это связано не только с действием различных факторов «агрессии» патогенных микроорганизмов, но и с запуском различных защитных систем и компенсаторных механизмов организма хозяина. В последнем случае происходит модуляция различных звеньев иммунной системы, одновременно меняется гормональный статус организма за счет выброса различных медиаторов, что приводит к изменению общего метаболизма. К настоящему времени существует мало работ по изучению влияния различных патогенов на гормональный статус насекомых (Алексеев и др., 2007; Wojda, Jakubowicz, 2007; Wojda et al., 2009; Wojda, Taszłow, 2013). Кроме того, основная масса этих исследований, как правило, проводилась на последних стадиях заболевания. В некоторых случаях можно отметить не совсем корректное моделирование инфекционного процесса, например микоза, когда заражение грибами осуществляли путем инъекции в гемоцель, что кардинально отличается от естественных путей проникновения в организм (Wojda et al., 2009). При этом следует отметить, что именно первые этапы являются ключевыми для патогенеза (Борисов и др., 2001). В частности, при возникновении микозов насекомых конидии энтомопатогенных грибов прикрепляются к поверхности кутикулы, после чего начинают прорастать. При этом грибы выделяют большое количество гидролитических ферментов и токсинов, что является стимулирующим фактором для иммунной и гормональной систем организма хозяина (Bidochka, Khachatourians, 1987, 1988, 1990; Bradfish, Harmer, 1990; Cavelier et al., 1998). При бактериозе, вызванном энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* проникновение патогена происходит через кишечник и если бактерии смогут преодолеть этот барьер, то это закончится септицемией. В связи с этим, уже на первых этапах инфекционного процесса насекомые подвергаются стрессирующему действию токсинов и гидролитических ферментов патогенных микроорганизмов (Roberts, Leger, 2004; Adang et al., 2014).

Вполне закономерно предположить, что ответ организма насекомого на заражение энтомопатогенами будет схожим с ответом на воздействия стресс-факторов химической природы: различных инсектицидов, поллютантов и т.д. В нашем исследовании при изучении бактериозов и микозов у разных видов насекомых отрядов *Lepidoptera* и *Coleoptera* были обнаружены изменения в уровнях ДА такие же, как при воздействии абиотических стресс-факторов (температуры и механических повреждений). При заражении энтомопатогенными бактериями и грибами происходило резкое повышение уровня ДА у колорадского жука, вошинной огневки и капустной совки. Кроме того, при заражении колорадского жука энтомопатогенными грибами и бактериями мы регистрировали повышение активности фенолоксидаз гемолимфы насекомых. Можно предположить, что ДА при развитии инфекционного процесса, с одной стороны выступает как иммуностимулятор, активируя клеточный иммунный ответ, с другой, непосредственно включаясь в меланотический каскад, участвует в образовании меланинов. Однако воздействие химических инсектицидов не привело к повышению уровня ДА. Возможно, подобное явление связано с механизмом действия выбранного нами инсектицида, который является необратимым ингибитором АХЭ (Pore, 1999). Также, возможно, это связано с низкими (сублетальными) дозами, которых недостаточно для запуска стресс-реакции.

Мы установили, что в зависимости не только от вида патогена, но и от его штаммовой принадлежности может меняться ответ организма на заражение, что выражается в разном уровне ДА. Так, штамм Р-72 энтомопатогенного гриба *M. robertsii* с токсигенной жизненной стратегией, характеризующийся высоким уровнем синтеза деструксинов (Крюков и др., 2011), на первых этапах инфекционного процесса вызывает более резкий подъем уровня ДА, чем штамм Мак-1 с биотрофной жизненной стратегией, у которого токсинов образуется значительно меньше.

Полученные нами результаты позволяют говорить о феноменологической закономерности в ответе на воздействие стресс-факторов различной природы как абиотических, так и биотических. Вероятно, ключевую роль здесь играют сигнальные пути активации физиологических систем организма насекомого, которые запускаются при нарушении покровов вследствие воздействия температуры и механических повреждений, или нарушении функционирования эпителиальных или эпидермальных клеток насекомых (при токсикозах, вызванных инсектицидами или энтомопатогенными микроорганизмами). Известно, что ДА как нейрогормон является одним из регуляторов энергетического метаболизма (Груntenко, 2008), поэтому повышение его уровня может увеличивать эффективность иммунной системы и репарационных процессов в ответ на повреждение патогенами. С другой стороны, увеличение уровня ДА может приводить к изменению вителлогенеза благодаря способности ДА регулировать уровень ювенильного гормона, который в свою очередь регулирует вителлогенез (Gruntenko, Rauschenbach, 2008; Gruntenko et al., 2012). В данном случае можно говорить о своеобразной «цене» за повышенную устойчивость к инфекциям (Lawniczak et al., 2006). Хотя данные

по влиянию ДА на формирование яйцекладок у насекомых немногочисленны и достаточно трудно говорить о его значении при формировании яиц, существуют работы, показывающие, что ДА необходим для нормального развития ооцитов (Bloch et al., 2000).

Таким образом, различные патогены, вызывающие заболевания насекомых могут выступать как стресс-факторы для организма насекомого. В связи с этим, вполне понятны общие закономерности увеличения уровня ДА при влиянии стрессирующих факторов абиотической природы и патогенов.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие стресс-факторов абиотической природы (перегрев, механические повреждения) приводит к повышению уровня дофамина в гемолимфе капустной совки *M. brassicae* и воцинной огневки *G. mellonella*.

2. При введении нейлонового имплантата в период активного формирования капсулы происходило увеличение активности фенолоксидаз гемолимфы личинок воцинной огневки *G. mellonella*, в то время как уровень дофамина не изменялся. Взаимосвязи между уровнем дофамина и интенсивностью инкапсуляции не выявлено.

3. При развитии микозов воцинной огневки *G. mellonella*, колорадского жука *L. decemlineata* и капустной совки *M. brassicae*, вызванных энтомопатогенными грибами *B. Bassiana* и *M. robertsii*, происходит резкое повышение уровня дофамина в гемолимфе.

4. Степень повышения уровня дофамина и активности фенолоксидаз в гемолимфе колорадского жука *L. decemlineata* зависит от свойств штаммов энтомопатогенного гриба *M. robertsii*. Штаммы с более высоким уровнем синтеза токсинов вызывают более выраженный ответ организма насекомого, что проявляется в повышенном уровне как дофамина, так и активности фенолоксидаз в гемолимфе личинок.

5. Уровень дофамина в гемолимфе личинок колорадского жука *L. decemlineata* повышается при инфицировании энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis* и зависит от количества инфекционного начала.

6. При совместной асинхронной обработке личинок колорадского жука грибом *M. robertsii* и фосфорорганическим инсектицидом пиримифос-метилом (ФОС) происходит значительное увеличение уровня дофамина при грибном заражении. Однако ФОС не влияет на уровень дофамина в гемолимфе обработанных насекомых.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в журналах из списка ВАК, рекомендованные для публикации основных материалов диссертаций:

Крюкова, Н. А. Формирование клеточного иммунного ответа *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) при паразитировании *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). / Н.А. Крюкова, И. М. Дубовский, Е. В. Гризанова, В. В. Глупов, **Е. А. Наумкина** // Евразийский энтомологический журнал. – 2007. – Вып. 6. – №. 4. – С. 361–364.

Бахвалов, С. А. Изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L) при питании на ранее дефолированной березе повислой (*Betula pendula* Roth). / С. А. Бахвалов, В. Н. Бахвалова, Н. А. Крюкова, Е. В. Гризанова, **Е. А. Наумкина**, Е. И. Шаталова // Евразийский энтомологический журнал. – 2008. – Вып.7. – №. 3. – С. 203– 206.

Dubovskiy, I. M. Generation of reactive oxygen species and antioxidants activity in hemolymph of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) larvae during encapsulation. / I. M. Dubovskiy, E. V. Grizanova, **Е. А. Chertkova**, I. A. Slepneva, D. A. Komarov, Y. L. Vorontsova, V. V. Glupov // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2010. – Vol. 46. – №. 1. – P. 35– 43.

Kryukova, N. A. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system and the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. / N. A. Kryukova, I. M. Dubovskiy, **Е. А. Chertkova**, Ya. L. Vorontsova, I. A. Slepneva, V. V. Glupov // Journal of Insect Physiology. – 2011. – Vol. 57. – P. 796–800.

Крюкова, Н.А. Динамика кальция в цитозоле гемоцитов личинок *Galleria mellonella* при клеточном иммунном ответе / Н.А. Крюкова, И.М. Дубовский, **Е.А. Черткова**, Е.В. Гризанова, В.В. Глупов // Евразийский энтомологический журнал. – 2013. – Вып. 5. – С. 421–424.

Kryukova, N. A. Venom from the ectoparasitic wasp *Habrobracon hebetor* activates the calcium-dependent degradation of the haemocytes in *Galleria mellonella* larvae haemolymph. / N. A. Kryukova, **Е. А. Chertkova**, A. D Semenova, Y. I. Glazachev, I. A. Slepneva, V. V. Glupov // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2015. – Vol. 90. – Issue 3. – P. 117–130.

Работы, опубликованные в материалах региональных, всероссийских и международных конференций:

1. Дубовский, И. М. Участие активированных кислородных метаболитов и антиоксидантов в реакции капсулообразования у личинок *Galleria mellonella*. / И. М. Дубовский, Е. В. Гризанова, **Е. А. Черткова**, И. А. Слепнева, Д. А. Комаров, Я. Л. Воронцова, В. В. Глупов // Материалы V Всероссийского съезда паразитологического общества при Российской

академии наук «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения». СПб. – 2008. Т.3. С. 245–246.

2. **Черткова, Е. А.** Изменение уровня дофамина в гемолимфе личинок капустной совки *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) при различных патогенезах. / **Е. А. Черткова** // Новые знания о паразитах. Материалы V Межрегиональной конференции «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке». Новосибирск. – 2015. С. – 131–132.