

**Изменение концентрации малонового диальдегида
и соотношения окисленных и восстановленных тиолов
в кишечнике вошинной огнёвки (*Galleria mellonella* L.)
при воздействии вторичных метаболитов растений**

**Change of malondialdehyde concentration, oxidated and reduced
thiols ratio in the midgut of wax moth (*Galleria mellonella* L.)
under treatment with plants secondary metabolites**

Б.А. Дуйсембеков*, А.А.Иванская, И.М. Дубовский ***
B.A. Duisembecov*, A.A. Ivanskaya**, I.M. Dubovskiy*****

* Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений им. Ж. Жиёмбаева, мкр. Рахат, ул. Казыбек би 1, Алматы 050070 Казахстан. E-mail: bduisembecov@mail.ru.

* Zh. Zhiembaev Kazakh scientific and research Institute for plant protection and quarantine, Rahat microdistrict, Kazybek bi Str. 1, Almaty 050070 Kazakhstan.

** Группа компаний «Энзим», Киев, Украина. E-mail: a.ivanskaya@agro.enzim.biz.

** Company «Enzim», Kiev, Ukraine

*** Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе, 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail: dubovskiy2000@yahoo.com.

*** Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Frunze Str. 11, Novosibirsk 630091 Russia.

Ключевые слова: экстракты растений, окислительный стресс, олений мох, усниновая кислота, вошинная огнёвка, антиоксиданты.

Key words: extracts of plants, oxidative stress, reindeer lichen, usnic acid, wax moth, antioxidants.

Резюме. Изучено воздействие вторичных метаболитов растений (пижмы, багульника и оленьего мха, содержащего высокое количество усниновой кислоты) на антиоксидантный статус в кишечнике вошинной огнёвки. Было зарегистрировано увеличение показателя окислительного стресса (соотношения восстановленных и окисленных тиолов) в вариантах при скармливании полярного экстракта пижмы, неполярного и полярного экстрактов багульника, а также полярной вытяжки оленьего мха зарегистрировано на фоне снижения показателя перекисного окисления липидов (концентрации малонового диальдегида). Полученные результаты свидетельствуют о нарушении окислительно-восстановительного гомеостаза в кишечнике личинок под воздействием вторичных метаболитов, входящих в состав изученных растений и лишайника.

Abstract. Effect of plants secondary metabolites (tansy, ledum and reindeer lichen with high content of usnic acid) on antioxidant status in the wax moth gut was studied. Increase in the oxidative stress (oxidated and reduced thiols ratio) was found under treatments with polar extract of tansy, polar and nonpolar extracts of ledum and polar extract of reindeer lichen against the low concentration of lipid peroxidation product (malondialdehyde). Collected data demonstrate malfunction of redox balance in the gut of wax moth larvae under feeding by secondary metabolites of studied plants and lichen.

Введение

В процессе эволюции у растений сформировалась комплексная биохимическая система, обеспечивающая защиту от различных фитофагов и патогенов [Felton et al., 1994; Taggar et al., 2014; Li et al., 2016]. Подобная защита обеспечивается, в первую очередь, за счёт синтеза различных вторичных метаболитов (ВМ), обладающих инсектицидной активностью, в основном за счёт того, что они способны взаимодействовать с эпителиальными клетками кишечника насекомых, а также блокировать активность многих пищеварительных ферментов [Salunke et al., 2009]. Данные взаимодействия приводят к снижению различных жизненно важных показателей организма насекомых, как то, восприимчивость к паразитам, снижение потребления кормового растения, веса фитофагов, репродукционного потенциала и т.д. Среди ВМ (как постоянно присутствующих в растениях, так и вновь синтезируемых под действием различных факторов) присутствуют несколько классов соединений, — от фенольных до белковых [Thipyahjng et al., 2007; Ingale et al., 2013; Taggar et al., 2014]. При взаимодействии ВМ с эпителиальными клетками насекомых

в организме последних могут происходить существенные изменения, в первую очередь, в антиоксидантной и детоксицирующих системах, а также в иммунной системе. Соответственно, в организме насекомых под действием ВМ может происходить увеличение образования активированных форм кислорода (АКМ), что может сопровождаться деструктивными процессами, в частности, не контролируемого окисления жиров, увеличение образования высокорекреационных свободных радикалов и т.д. Следует отметить, что у различных живых организмов, в том числе и насекомых, сформировался комплекс различных систем, контролирующих окислительные процессы организма [Felton, Summers, 1995]. Данные антиоксиданты можно условно разделить на ферментные и неферментные. Среди неферментных антиоксидантов существенную роль в поддержании гомеостаза организма играют белковые и небелковые тиол-содержащие соединения. Эти соединения могут участвовать как в ферментативных реакциях антиоксидантных ферментов, так и непосредственно взаимодействовать с высокорекреационными молекулами. Накопление окисленных продуктов в организме может сопровождаться возникновением так называемого окислительного стресса. Соответственно, можно регистрировать изменения в окислительном балансе организма по накоплению подобных продуктов. А по соотношению окисленных и восстановленных тиол-содержащих продуктов можно судить об уровне активности реакций, направленных на элиминацию высокорекреационных соединений. В частности, при окислении полиненасыщенных жиров образуется большое количество высокорекреационных соединений, в том числе и малоновый диальдегид (МДА) [Del Rio et al., 2005]. Этот альдегид обладает высокой токсичностью и может служить своеобразным маркером перекисного окисления липидов (ПОЛ) и, соответственно, окислительного стресса организма. МДА способен реагировать с ДНК и белками, то есть обладает потенциальной мутагенной активностью [Marnett, 1999; Del Rio et al., 2005]. К сожалению, работы по изучению влияния ВМ растений на организм насекомых проводятся sporadически [Jonson, Felton, 2001; Barbehenn et al., 2001; Barbehenn et al., 2003; Bruce, 2015].

В данной работе, основываясь на литературных данных, был отобран ряд растений, распространённых на территории Западной Сибири, и обладающих антагонистическими свойствами по отношению к насекомым — пижма обыкновенная *Tanacetum*

vulgare L., багульник болотный *Ledum palustre* L. и олений мох *Cladonia stellaris* Opiz. [Krylov, 1972; Minaeva, 1991]. Также была использована усниновая кислота, которая является биоактивным компонентом и входит в состав вторичных метаболитов оленьего мха [Cocchietto et al., 2002]. Целью исследования было изучение антиоксидантного статуса в кишечнике личинок воштинной огнёвки под влиянием экстрактов и метаболитов данных растений, оленьего мха, а также усниновой кислоты.

Материалы и методы

Скармливание экстрактов насекомым. Общие, полярные и неполярные экстракты, а также усниновую кислоту получали сотрудники института органической химии СО РАН из высушенных частей растений (табл. 1). В качестве экстрагентов биоактивных веществ использовали: гексан, петролейный эфир 40–70 °С, спирт этиловый, спирт изопропиловый [Polovinka et al., 2006].

В экспериментах использовали личинок большой воштинной огнёвки *Galleria mellonella* (Lepidoptera) IV возраста из лабораторной популяции Института систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск. Насекомых содержали в чашках Петри по 20 личинок при 28 °С, в темноте, на искусственной питательной среде. Использовали 0,1 % концентрации веществ на 1 г корма. Концентрации МДА и соотношение тиолов измеряли на девятые сутки после скармливания экстрактов и усниновой кислоты.

Определение концентрации МДА и концентрации тиолов. Для приготовления гомогенатов кишечника насекомых препарировали в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,2 с 150 мМ NaCl (ФБ). Извлеченные органы растирали в стеклянном гомогенизаторе с холодным ФБ в соотношении 0,1 г на 1 мл буфера. Затем гомогенаты центрифугировали при 4 °С в течение 15 мин при 10000 г. Полученный супернатант использовали для определения концентрации тиолов и МДА.

Концентрацию малонового диальдегида в гомогенатах кишечника определяли с помощью колориметрического метода определения МДА в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с модификациями [Dubovskiy et al., 2008]. В данной реакции образуется окрашенный хромофор (максимум поглощения 532 нм), определяемый спектрофотометрически. Для определения концентрации МДА к 250 мкл образца (гомогенат кишечника) добавляли 125 мкл 20 %

Таблица 1. Растения и лишайник, отобранные для тестирования на личинках воштинной огнёвки *G. mellonella*
Table 1. Plants and lichen selected for testing on wax moth *G. mellonella* larvae

Русское название	Латинское название	Части, используемые для экстракции	Тип экстракции
Пижма обыкновенная	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	Цветки	Общий, полярный, неполярный
Багульник болотный	<i>Ledum palustre</i> L.	Побеги	Полярный, неполярный
Олений мох	<i>Cladonia stellaris</i> Opiz.	Надземная часть	Полярный, неполярный

трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и центрифугировали при 10000 г 10 минут. К 300 мкл полученного супернатанта добавляли 200 мкл 0,8 % ТБК и выдерживали на водяной бане 60 минут. Концентрацию малонового диальдегида определяли спектрофотометрически по окрашенному продукту при 532 нм в расчете на 1 мг белка.

Для определения концентрации восстановленных (RSH) и окисленных (RSSR) тиолов использовали спектрофотометрический метод, основанный на окислении RSH 2-нитро 5-тиобензойной кислотой (DTNB) с модификациями [Dubovskiy et al., 2008]. RSSR предварительно разрушали до RSH 1М соляной кислотой (HCl) 20 мин (на 50 мкл образца кишечника 10 мкл HCl), после чего pH образца доводили до 7 гидроксидом натрия. Концентрацию RSH и RSH+RSSR измеряли при 412 нм после 10 мин инкубации 50 мкл образца в 500 мкл 0,001 % раствора DTNB в ФБ при 37°C. Концентрацию RSH и RSSR определяли согласно калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали глутатион.

Концентрацию белка в гомогенатах кишечника определяли по методу Бредфорда. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку. Для проверки нормальности распределения данных использовали W критерий Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий определяли однофакторным дисперсионным анализом с post-hoc тестом Бонферрони (one-way ANOVA, Bonferroni's test) и t-тестом (t test) (Prizm 5.04).

Результаты и обсуждение

При скармливании полярного экстракта пижмы, неполярного и полярного экстрактов багульника, а также полярной вытяжки оленьего мха (рис. 1) и усниновой кислоты (рис. 2) зафиксировано достоверное уменьшение концентрации МДА в кишечнике на 9-е сутки эксперимента.

Снижение концентрации МДА в вариантах со скармливанием экстрактов растений антагонистов может свидетельствовать о снижении активности процессов ПОЛ в кишечнике насекомых. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что неконтролируемое увеличение активности ПОЛ при питании ВМ растений происходит при острых воздействиях. Так, при скармливании 5 % концентрации таниновой кислоты показано десятикратное увеличение концентрации гидропероксидов [Varbehenn et al., 2001]. При менее острых влияниях концентрация гидропероксидов не менялась. В частности, при исследовании антиоксидантного статуса в кишечнике насекомых, питающихся на ген-модифицированном табаке с различной продукцией фенолов, не обнаружено достоверных отличий в концентрации гидропероксидов [Jonson, Felton, 2001]. В наших исследо-

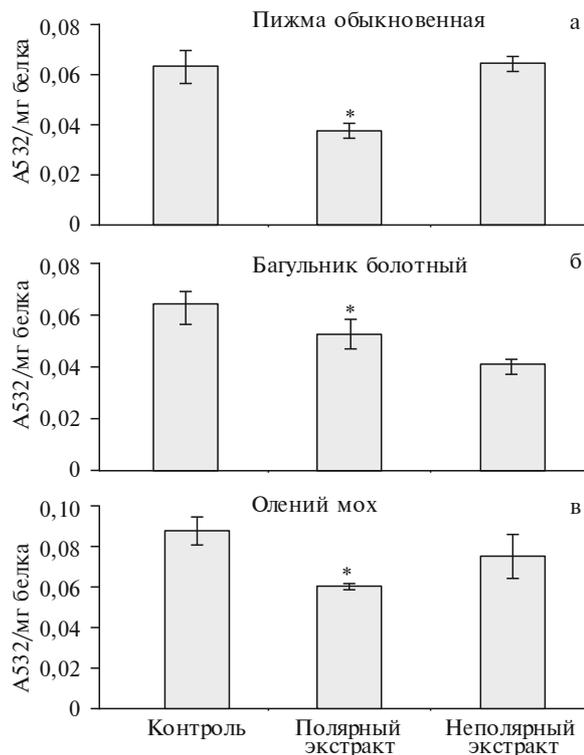


Рис. 1. Концентрация МДА в кишечнике личинок *G. mellonella* при скармливании полярных и неполярных экстрактов пижмы обыкновенной *T. vulgare* (а), багульника болотного *L. palustre* (б) и оленьего мха *C. stellaris* (в) (one-way ANOVA, Bonferroni's test; n = 10; * — p < 0,05 по сравнению с контролем (нативные личинки)).

Fig. 1. Concentration of malondialdehyde in gut of wax moth *G. mellonella* under feeding by polar and nonpolar extracts of tansy *T. vulgare* (a), ledum *L. palustre* (б) and reindeer lichen *C. stellaris* (в) (one-way ANOVA, Bonferroni's test; n = 10; * — p < 0,05 compare with control (native larvae)).

ваниях мы использовали 0,1 % концентрации экстрактов растений, не обладающих выраженной антагонистической активностью. Можно предположить, что отмеченное нами снижение концентрации МДА, а, следовательно, и процессов ПОЛ, является следствием активности компонентов антиоксидантной системы насекомых. Кроме того, следует отметить,

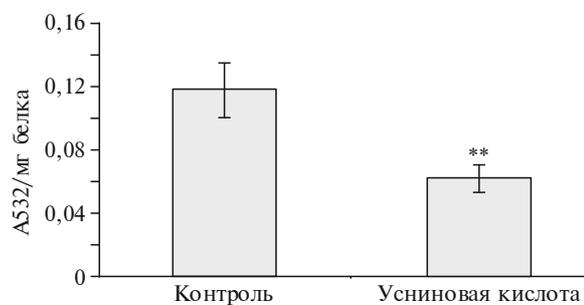


Рис. 2. Концентрация МДА в кишечнике личинок *G. mellonella* при скармливании усниновой кислоты (0,1 %) (t test; n = 10; ** — p < 0,01 по сравнению с контролем (нативные личинки)).

Fig. 2. Concentration of malondialdehyde in gut of wax moth *G. mellonella* under feeding by usnic acid (0,1 %) (t test; n = 10; ** — p < 0,01 compare with control (native larvae)).

что ВМ могут влиять на окислительно-восстановительный баланс за счет антиоксидантных свойств, выступая в качестве ловушек АКМ [Johnson, Felton, 2001; Marante et al., 2003]. В результате исследований усниновой кислоты нами было зафиксировано отсутствие антиоксидантных свойств у этого ВМ.

При скармливании полярного экстракта пижмы, неполярного и полярного экстрактов багульника, а также полярной вытяжки оленьего мха зафиксировано достоверное увеличение окислительной модификации тиолов на 9-е сутки эксперимента (рис. 3). Питание насекомых кормом с содержанием неполярных экстрактов оленьего мха, мха сфагнома и усниновой кислоты не сопровождалось изменением отношения окисленных и восстановленных тиолов по сравнению с контрольными вариантами.

Как уже упоминалось ранее, тиол-содержащие соединения являются важным компонентом поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках и тканях. При различных стрессовых воздействиях и патологических состояниях наблюдается обратимая окислительная модификация SH-групп, приводящая к увеличению количества дисульфидных связей (окисленных тиолов), что является неспецифической реакцией организма на различные экстремальные воздействия [Sokolovskij, 1988]. К сожалению, в немногочисленных исследованиях роли антиоксидантной системы в организме насекомых при действии ВМ растений оценивается в основном лишь концентрация глутатиона (GSH) [Peric-Mataruga et al., 1997; Barbehenn et al., 2001; Barbehenn et al., 2003], но не изучается отношение всех окисленных и восстановленных тиол-содержащих соединений (RSSR/RSH). Поэтому сложно провести параллели между полученными нами результатами и другими исследованиями антиоксидантов при действии ВМ растений. Тем не менее, увеличение показателя RSSR/RSH в вариантах при скармливании полярного экстракта пижмы, неполярного и полярного экстрактов багульника, а также неполярной вытяжки оленьего мха зарегистрировано на фоне снижения концентрации МДА в этих вариантах (рис. 1–3). Это может свидетельствовать о нарушении окислительно-восстановительного гомеостаза в кишечнике личинок под действием ВМ, входящих в состав экстрактов растений, подавляющих развитие насекомых. Также полученные результаты подтверждают предположение, что отмеченное нами снижение концентрации МДА, а, следовательно, и процессов ПОЛ, может являться следствием активности ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной системы насекомых. В любом случае, изменения в окислительно-восстановительном гомеостазе личинок под действием ВМ растений, зарегистрированные нами в представленных экспериментах, могут существенно сказываться на общем физиологическом состоянии организма насекомых, и, как следствие, значительно влиять на состояние популяции фитофагов, возможно и на восприимчивость к различным инфекциям.

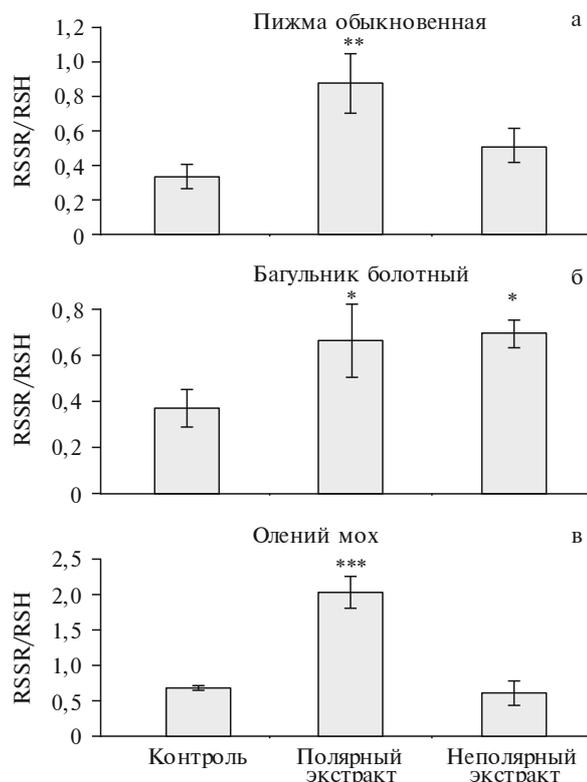


Рис. 3. Соотношение концентрации окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSH) в кишечнике личинок *G. mellonella* при скармливании полярных и неполярных экстрактов пижмы обыкновенной *T. vulgare* (а), багульника болотного *L. palustre* (б) и оленьего мха *C. stellaris* (в) (one-way ANOVA, Bonferroni's test; n = 10; * — p < 0,05; ** — p < 0,01; *** — p < 0,001 по сравнению с контролем (нативные личинки)).

Fig. 3. Oxidated and reduced thiols ratio (RSSR/RSH) in gut of wax moth *G. mellonella* under feeding by polar and nonpolar extracts of tansy *T. vulgare* (a), ledum *L. palustre* (б) and reindeer lichen *C. stellaris* (в). (one-way ANOVA, Bonferroni's test; n = 10; * — p < 0.05; ** — p < 0.01; *** — p < 0.001 compare with control (native larvae)).

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института органической химии СО РАН (г. Новосибирск) за предоставление экстрактов растений и последующую их очистку и разделение.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (№ 15-14-10014).

Литература

- Barbehenn R.V., Bumgarner S.L., Roosen E.F., Martin M.M. 2001. Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen // *Journal of Insect Physiology*. Vol.47. P.349–357.
- Barbehenn R.V., Walker A., Uddin F. 2003. Antioxidants in the midgut fluids of a tannin-tolerant and a tannin-sensitive caterpillar: effects of seasonal changes in tree leaves // *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 29. No.5. P.1099–1116.
- Bruce T.J. 2015. Interplay between insects and plants: dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds // *Journal of Experimental Botany*. Vol.66. No.2. P.455–465

- Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G. 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound // *Naturwissenschaften*. Vol.89. P.137–146.
- Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Vol.15. P.316–328.
- Dubovskiy, I. M., Martemyanov V.V., Vorontsova Y.L., Rantala M.J., Gryzanova E.V., Glupov V.V. 2008. Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). // *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. Vol.148. No.1. P.1–5.
- Felton G. W., Summers C. B. 1995. Antioxidant systems in insects // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. Vol.2. P.187–197.
- Felton G.W., Summers C.B., Mueller A.J. 1994. Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa hopper // *Journal of Chemical Ecology*. Vol.20. P.639–650.
- Ingale A.G., Hivrale A.U. 2013. Plant as a plenteous reserve of lectin // *Plant Signaling Behavior*. Vol.8. No.12. P.e26595.
- Johnson K.S., Felton G.W. 2001. Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco // *Journal of Chemical Ecology*. Vol.27. No.12. P.2579–2597.
- Krylov G.V. 1972. [Travy zhizni i ih iskateli] Novosibirsk: Zapadno-Sibirskie knizhnoe izdatelstvo. 448 p. [In Russian].
- Li D., Baldwin I.T., Gaquerel E. 2016. Beyond the Canon: Within-Plant and Population-Level Heterogeneity in Jasmonate Signaling Engaged by Plant-Insect Interactions // *Plants (Basel)*. Vol.5. No.1. P.14.
- Marante F.J.T., Castellano A.G., Rosas F.E., Aguiar J.Q., Barrera J.B. 2003. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity // *Journal of Chemical Ecology*. Vol.29. No.9. P.2049–2071.
- Marnett L.J. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde // *Mutation Research*. Vol.424. No.1–2. P.83–95.
- Minaeva V.G. 1991. [Lekarstvennye rasteniya Sibiri] Novosibirsk. Nauka. 430 p. [In Russian]
- Peric-Mataruga V., Blagojevic D., Spasic M. B., Ivanovic J., Jankovic-Hladni M. 1996. Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. Caterpillars of population origins // *Journal of Insect Physiology*. Vol.43. P.101–106.
- Polovinka M.P., Salahutdinov N.F., Panchenko M. [YU Patent RF 2317076 ot 17 04 2006 g Sposob polucheniya usninovoj kisloty] [In Russian]
- Salunke, B.K., Prakash, K., Vishwakarma, K.S., Maheshwari, V.L. 2009. Plant metabolites: an alternative and sustainable approach towards post harvest pest management in pulses // *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*. Vol.15. P.185–197.
- Sokolovskij V.V. 1988. [Tiolovye antioksidanty v molekulyarnyh mekhanizmah nespecificheskoj reakcii organizma na ehkstreimalnoe vozdejstvie] // *Voprosy medicinskoj himii*. Vol.6 P.2–11. [In Russian]
- Taggar G.K., Gupta A.K., Singh S. 2014. Induced changes in the antioxidative compounds of *Vigna mungo* genotypes due to infestation by *Bemisia tabaci* (Gennadius) // *Journal of Environmental Biology*. Vol.35. P.1037–1045.
- Thipyahjng P., Stout M.J., Attajarusit J. 2007. Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology // *Molecules*. Vol.12. P.1569–1595.

Поступила в редакцию 12.7.2016