

## ***In vitro* тест на личинках комнатной мухи (*Musca domestica*) для оценки активности 20-гидроксиэкдизона**

### ***In vitro* test with house fly (*Musca domestica*) larvae for evaluation of 20-hydroxyecdysone activity**

**Г.В. Беньковская\*, Р.Г. Савченко\*\*  
G.V. Benkovskaya\*, R.G. Savchenko\*\***

\* Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, пр. Октября 71, Уфа 450054 Россия. E-mail: bengal2@yandex.ru.

\* Institute of Biochemistry and Genetics, Ural Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Oktyabr'ya Ave. 71, Ufa 450054 Russia.

\*\* Институт нефтехимии и катализа УФИЦ РАН, пр. Октября 141, Уфа 450075 Россия. E-mail: rimasavchenko@mail.ru.

\*\* Institute of Petrochemistry and Catalysis, Russian Academy of Sciences, Oktyabr'ya Ave. 141, Ufa 450075 Russia.

**Ключевые слова:** 20-гидроксиэкдизон, комнатная муха, тест *in vitro*.

**Key words:** 20-hydroxyecdysone, house fly, test *in vitro*.

**Резюме.** Представлена процедура модифицированного теста для оценки экдизоноподобной активности на примере 20-гидроксиэкдизона (20E). В нашей модификации использована экспозиция покровно-мышечных тканей личинок комнатной мухи в среде с добавлением 20E вместо лигатурирования личинок. Процедура подготовки образцов и регистрации результатов позволяет сократить время скрининга и стандартизировать количественную оценку активности.

**Abstract.** The procedure of modified test for evaluation of ecdyson-like activity of 20-hydroxyecdysone is presented. The modification includes exposure of cuticle-muscle tissues of house fly larvae in the medium with added compounds under test instead of ligated larva. Procedure of sample preparation and registration of test results allows reducing the screening time and standardizing the quantitative assessment of activity of compounds.

## **Введение**

Со времени открытия экдизона и экдистероидов, контролирующих развитие, репродукцию и метаболизм насекомых, прошло более 60 лет, и за это время разработано немало тестов для оценки гормональной активности природных и синтетических экдистероидов. В их число входит *Musca*-тест, разработанный для комнатной мухи [Kaplanis et al., 1966] как модификация применявшегося каллифора-теста, но проявивший более высокую чувствительность. Тест проводится в системе *in vivo*, и в его основе лежит метод наложения лигатур, отделяющих брюшной отдел тела личинки от зоны расположения проторакальных желез, и последующее введение испытуемого вещества. Процедуры подготовки личинок требуют большой массы исходного материала с высокой степенью синхронизации развития. Отбор пригодных для теста личинок, готовых к началу склеротизации, давал не более 20–30 % от начального количе-

ства [Kaplanis et al., 1966]. Весь процесс теста занимает в этой модификации 3 рабочих дня и завершается 4-балльной оценкой степени склеротизации покровов отделённой лигатурой части абдомена. Полученные для 5 особей данные могут служить для первичного скрининга большого количества соединений с целью выбраковки не обладающих экдизонной активностью. Мы предлагаем модификацию теста для быстрой и достоверной оценки экдизоноподобной активности соединений экдистероидного типа, рассчитанную на систему *in vitro* и использование для теста набора лабораторных линий комнатной мухи, различающихся продолжительностью жизни и реакцией на 20-гидроксиэкдизон (20E) и его синтетические аналоги на организменном уровне [Savchenko et al., 2015].

## **Отбор и подготовка личинок**

Ведение линий комнатной мухи в лабораторных условиях осуществляется по стандартной методике [Benkovskaya, 2017]. Для синхронизации развития личинок стаканы для откладки яиц с увлажнёнными отрубями помещали в садки с половозрелыми имаго на 4–6 часов. Через 7 суток отбирали личинок с минимальными различиями в размерах и массе тела (1 особь в среднем весит  $20 \pm 1,8$  мг), промывали в дистиллированной воде и рассаживали в чашки Петри диаметром 9 см на стерильные бумажные фильтры, смоченные водой, по 10–15 особей на чашку. Отбор проводился в утренние часы.

## **Процедура теста**

Для теста использовали стерильные пластиковые плашки для работ с культурами клеток с плоским дном и крышкой, объём ячейки 400 мкл (Cellstar,

USA). В качестве среды для проведения теста использовали стерильный физиологический раствор (ФР), разведённый в 10 раз. В каждой ячейке итоговый объём среды для инкубации составлял 100 мкл. 20Е вносили в среду для инкубации из расчёта конечной концентрации раствора  $1 \times 10^{-7}$  М, что соответствует минимуму обнаружения экдизонной активности в Musca-тесте [Kaplanis et al., 1966]. В контроле применяли ФР без добавок. Отобранных личинок препарировали в 300 мкл стерильного ФР. Отсекали глазным скальпелем анальный сегмент и первые 4 сегмента тела, освобождали тонким пинцетом полученное «филе» (заднюю часть тела, состоящую из 7 сегментов) от всех внутренних органов и после прополаскивания помещали в ячейку с инкубационной средой. Для вариантов 20Е и контроля брали 5–10 образцов «филе», состоящих из 6–7 сегментов.

Процедуру проводили в дневные часы (с 12 до 17 часов). Через 1–2 часа после начала экспозиции образцов в инкубационной среде с добавкой 20Е фиксировали состояние среды в плашках, добавляя в инкубационную среду в каждой ячейке по 20 мкл 0,001 %-ного раствора гентамицина (Беларусь, Белмедпрепараты). Инкубация проходила в лабораторном помещении при комнатной температуре 24–27 °С. Через 24 часа инкубированные образцы переносили пинцетом в дистиллированную воду для отмывания, обсушивали на бумажном фильтре и расправляли в поле крышки от соответствующей ячейки (рис. 1). После завершения процедуры крышку переворачивали и фотографировали в проходящем свете на белом фоне с использованием опции макросъёмки.

### Оценка результатов теста

Фотографии расправленных образцов позволяют проводить компьютерную обработку результатов даже без использования специальных программ. С помощью пакета Excel 2003 с увеличенной до удобного размера фотографии для каждого образца вносят данные о количестве сегментов, на которых появилась зона склеротизации (рис. 1, а), после чего рассчитывается среднее число таких зон с ошибкой. Для оценки статистической значимости различий между контролем и 20Е использован t-критерий Стьюдента.

### Результаты теста и их интерпретация

В 10 тестах на 750 личинках комнатной мухи из 3 лабораторных линий коллекции лаборатории физиологической генетики Института биохимии и генетики УФИЦ РАН мы получили результаты, свидетельствующие о высокой чувствительности предлагаемого теста (табл. 1).

Существенные статистические различия между значениями для контрольных вариантов и 20Е для



Рис. 1. Реакция покровно-мышечных тканей личинки комнатной мухи на 20-гидроксиэкдизон: а — 24 часа с начала инкубации в среде с добавкой 20Е; б — контроль. Стрелками указаны зоны склеротизации, учитываемые в тесте.

Fig. 1. Reaction of cuticle-muscle tissues of house fly larva to 20-hydroxyecdysone: a — after 24 hours of incubation in medium with 20E added; b — control sample. Arrows show sclerotization zones calculated in test procedure.

всех использованных нами лабораторных линий комнатной мухи позволяют считать этот тест пригодным для первичного отбора соединений с предполагаемой экдизонной активностью. В качестве стандарта для сравнения активности новых синтетических соединений экдистероидного типа предполагается применение 20Е. Вся процедура тестирования занимает 2 рабочих дня и позволяет избежать больших потерь биоматериала.

Таблица 1. Реакция на 20-гидроксиэкдизон ( $1 \times 10^{-7}$  М) в тесте *in vitro* на личинках комнатной мухи  
 Table 1. The reaction to 20-hydroxyecdysone ( $1 \times 10^{-7}$  M) in test *in vitro* with house fly larvae

Линия	Количество личинок	Доля образцов с проявлением реакции склеротизации, %		Число зон склеротизации (среднее $\pm$ SE)		p
		контроль	20E	контроль	20E	
S	110	45	100	1,4 $\pm$ 0,29	4,2 $\pm$ 0,19	0,0003
<i>L gen</i>	180	80	100	1,4 $\pm$ 0,49	4,0 $\pm$ 0,31	0,0005
<i>Sh gen</i>	180	40	100	0,4 $\pm$ 0,12	4,6 $\pm$ 0,19	0,00006

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-03-00603\_а.

Savchenko R.G., Kostyleva, S.A., Odinkov V.N., Akhmetkireeva T.T., Benkovskaya G.V. 2015. Stress- and Geroprotective properties of 20-Hydroxyecdysone and its Derivatives // Advances in Gerontology. Vol.5. No.4. P.247–251.

### Литература

Benkovskaya G.V. 2017. [Principles of maintaining laboratory strains of insects] // Biomika. Vol.9. No.1. P.24–32. [In Russian].

Kaplanis J.N., Tabor L.A., Thompson M.J., Robbins W.E., Shortino T.J. 1966. Assay for ecdysone (molting hormone) activity using the house fly, *Musca domestica* L. // Steroids. Vol.8. No.5. P.625–631.

Поступила в редакцию 10.12.2018