

ГЕНЕРАЦИЯМ АКТИВИРОВАННЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТОВ В ГЕМОЛИМФЕ ЛИЧИНОК *GALLERIA MELLONELLA* (LEPIDOPTERA: PIRALIDAE) ПРИ РАЗВИТИИ ПРОЦЕССА ИНКАПСУЛЯЦИИ

© И. М. Дубровский,* Е. В. Гризанова,* Е. А. Черткова,** И. А. Слепнева,**
Д. А. Комаров,** Я. Л. Воронцова,* В. В. Глухов,*

* Институт систематики и экологии животных СО РАН;

** Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск, Россия
E-mail: dubovskiy2000@yahoo.com

Резюме

Проведены исследования активности ферментативных антиоксидантов — супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы и каталазы — в гемоцитах и изучена генерация активированных кислородных метаболитов (АКМ) в лимфе личинок большой вощиной моли *Galleria mellonella* L. при развитии процесса инкапсуляции нейлоновых имплантатов. Установлено, что уже через 15 мин после прокола кутикулы имплантантом происходит образование капсулы на его поверхности. Показано, что активная меланизация капсулы продолжается в течение 4 ч. При этом зарегистрировано достоверное увеличение генерации АКМ в лимфе и снижение активности ферментативных антиоксидантов в гемоцитах насекомых после внедрения имплантанта. Авторы предполагают, что ключевую роль в поддержании окислительно-восстановительного баланса в гемолимфе при развитии процесса инкапсуляции выполняют неферментативные антиоксиданты лимфы.

Ключевые слова: иммунитет насекомых, клеточные иммунные реакции, активированные кислородные метаболиты, гемоциты, супероксиддисмутаза.

Введение

Беспозвоночные, в частности насекомые, обладают развитой системой врожденного иммунитета, направленной на уничтожение проникающих патогенов и паразитов. При проникновении паразита и повреждении кутикулы и эпидермальных клеток происходит выброс в гемоцель за уничтожение небольших объектов, которые не превышают размера самих гемоцитов, а также инкапсуляцию более крупных объектов, заключающуюся в их изоляции и инактивации. Известно, что процесс инкапсуляции начинается с первых минут после проникновения инородного объекта и активно протекает в течение 24 ч [1, 2]. Установлено, что гемоциты играют ключевую роль в процессе инкапсуляции, прикрепляясь к поверхности частицы и участвуя в образовании капсулы [2]. Одновременно по каскадному принципу активируются фенолоксидазы, запускающие меланогенез, в результате которого образуется нерастворимый полимер — меланин [3]. Установлено, что процесс меланизации у насекомых сопровождается образованием потенциально ток-

сичных активированных кислородных метаболитов (АКМ), в том числе семихиноновых радикалов [4], перекиси водорода [5, 6], супероксид аниона [7, 8]. Показано, что увеличение генерации АКМ происходит при развитии паразитозов у мух *Drosophila* [7, 9]. Также установлено, что повышение генерации АКМ происходит при развитии микозов и микроспориidioзов у личинок *Galleria mellonella* [10, 11]. Установлена ключевая роль АКМ в инкапсуляции и уничтожении *Plasmodium* у комара *Anopheles* [12, 13]. Проведены исследования, свидетельствующие об участии гемоцитов в продукции АКМ у насекомых [8, 14, 15]. Предполагается, что АКМ, образующиеся при инкапсуляции, могут участвовать в уничтожении паразита за счет высокой реакционной способности [16]. Следует отметить, что цитотоксическое действие АКМ может быть направлено, как на энтомопатогенов, так и на клетки и ткани хозяина. Цитотоксическое действие АКМ может приводить к неконтролируемому увеличению перекисного окисления липидов; кроме того, АКМ могут повреждать ДНК и белковые молекулы [17].

В организме насекомых, как и у многих других животных, существует комплекс антиоксидантных и детоксицирующих ферментов, действие которых направлено на элиминацию АКМ [18]. У животных, в том числе у насекомых, выделяют ряд важнейших компонентов антиоксидантной системы, подразделяя их на ферментативные антиоксиданты (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатион-S-трансфераза (ГТ), пероксидазы) и неферментативные антиоксиданты (фенолсодержащие соединения, α -токоферол, аскорбиновая кислота высоко- и низкомолекулярные тиолы) [18, 19]. Ферментативные антиоксиданты характеризуются высокой специфичностью действия, направленного против определенных форм АКМ. СОД катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) в перекись водорода (H_2O_2), каталаза разлагает H_2O_2 , ГТ защищает клетки от ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления липидов посредством их восстановления, с участием восстановленного глутатиона [17, 18, 20].

Известно, что ряд ферментативных антиоксидантов, ингибируя генерацию АКМ, может тормозить и процесс меланогенеза. Показано, что каталаза и СОД могут снижать интенсивность окисления 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дофамина фенолоксидазой [21]. Однако также установлено, что СОД необходима для образования тирозил-радикала и других цитотоксических АКМ, участвующих в элиминации паразита [22].

Таким образом, с одной стороны, антиоксиданты участвуют в контроле меланогенеза и могут его блокировать, с другой, — выступают важнейшим атрибутом активности АКМ, направленной против паразитов. К сожалению, большинство работ, описывающих роль антиоксидантов при меланогенезе, проводятся *in vitro* с использованием экзогенных ферментов и позволяют лишь смоделировать процессы, происходящие в организме насекомых [5, 21]. Неясной остается роль АКМ и антиоксидантов в процессе инкапсуляции чужеродного объекта. Также слабо изучено значение антиоксидантов в гемоцитах, играющих ключевую роль в меланизации и инкапсулярных инородных объектов.

В связи с этим цель наших исследований заключалась в изучении компонентов антиоксидантной системы, участвующих в контроле генерации АКМ при развитии процесса инкапсуляции у насекомого. Для этого были проведены исследования активности ферментативных антиоксидантов СОД, ГТ и каталазы в гемоцитах и изучена генерация АКМ в лимфе личинок большой вошиной моли *Galleria mellonella* при развитии процесса инкапсуляции нейлоновых имплантантов.

Материалы и методы

Реактивы. В работе использовали восстановленный глутатион, 1-хлор-2,4-динитробензол (ДПБ), ксантинооксидазу, нитросиний тетразолий (НСТ), бычий сывороточный альбумин (БСА), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), дигидрооксифенилаланин (ДОФА), НЕРЕС (Sigma, США).

Насекомые. Лабораторную популяцию *G. mellonella* содержали при 28 °С на искусственной питательной среде, в составе которой присутствовали пчелиный мед (15 %), воск (15 %), глицерин (15 %), сухое молоко (15 %), кукурузная и пшеничная мука (40 %). Исследования проводили на личинках 5—6-го возраста.

Нейлоновые имплантанты. В экспериментах использовали имплантанты длиной 2 мм и диаметром 0.5 мм, изготовленные из нейлоновой нити. Имплантанты вводили в гемоцель личинок большой вошиной моли 6-го возраста через прокол в четвертом вентральном сегменте кутикулы. Через различные промежутки времени — 15, 30, 60 мин, 4 и 24 ч имплантанты вынимали и использовали для анализа степени потемнения и толщины образовавшейся на них меланотической капсулы. Параллельно в эти же временные отрезки проводили забор гемолимфы насекомых для исследования активности СОД, каталазы, ГТ в гемоцитах и генерации АКМ и перекиси водорода в лимфе.

Измерение интенсивности инкапсуляции. Интенсивность инкапсуляции оценивали по степени потемнения и толщине меланотической капсулы, образовавшейся на поверхности нейлонового имплантанта. Для оценки степени потемнения капсулы извлеченные имплантанты фотографировали с трех различных сторон. Интенсивность инкапсуляции оценивали по степени потемнения капсулы с использованием программы Image J [23, 24].

Для оценки толщины образовавшейся капсулы извлеченные имплантанты дегидрировали в серии градиента ацетона и затем помещали в смесь смол эпон—аралдит на 24 ч при 60 °С. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы с помощью ультратома LKB 3. Толщину меланотической капсулы на срезах оценивали с помощью светового микроскопа (Axioscop 40, Карл Цейс, Германия).

Приготовление образцов гемоцитов и лимфы. Для получения образцов гемоцитов и лимфы гемолимфу собирали в пластиковые пробирки с охлажденным (4 °С) антикоагулянтом, содержащим (ммоль/л): 62 NaCl, 100 глюкозы, 10 ЭДТА, 30 цитрата натрия, 26 лимонную кислоту, pH 4.6. Затем гемолимфу центрифугировали 5 мин при 500 g. Супернатант использовали в качестве образцов лимфы. Для получения образца гемоцитов полученный осадок ресуспендировали и трижды отмывали в антикоагулянте по 5 мин при 500 g и один раз в НЕРЕС-буфере pH 7.2, содержащим (мМ): 10 НЕРЕС, 140 NaCl, 5 KCl, 6 глюкозу.

Определение активности СОД, каталазы, ГТ. Активность СОД определяли спектрофотометрически при 560 нм по подавлению скорости восстановления нитросинего тетразолия супероксид-анионом, образующимся в процессе окисления ксантина ксантинооксидазой [25]. К 500 мл реакционной смеси, содержащей 5 мг/мл БСА, 70 мкМ НСТ, 125 мкМ ксантина в фосфатном буфере (ФБ), добавляли 80 мкл образца, после чего реакцию инициировали добавлением 20 мкл раствора ксантинооксидазы (5.87 ед. акт./мл) и инкубировали при 28 °С в темноте в течение 20 мин. Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси по сравнению с контрольной при 560 нм в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

Активность глутатион-S-трансферазы определяли спектрофотометрически при 340 нм по скорости увеличения концентрации 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, продукта реакции динитроберзола (ДНБ) и восстановленного глутатиона, катализируемой ГТ [26]. Инкубацию проводили при 22 °С в течение 5 мин в 500 мкл ФБ, содержащем 1 мМ глутатиона, 1 мМ ДНБ и 20 мкл опытного образца. Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси при 340 нм в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при 240 нм по скорости разложения H_2O_2 [27]. К 600 мкл реакционной смеси (150 мкл 3%-ной H_2O_2 в 450 мкл ФБ) добавляли 5 мкл опытного образца и инкубировали 10 мин при 22 °С. Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси при 240 нм в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

Измерение скорости генерации АКМ. Изучение скорости генерации АКМ в лимфе проводили методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), используя в качестве спиновой ловушки стерически затрудненный раствор гидросиламина (СРГ), который окисляется АКМ с образованием стабильного нитроксильного радикала, СР [28]. Раствор СР (10 мМ) готовили перед экспериментом, растворяя навеску в отдутом аргоном ФБ. В образце гемолимфы добавляли СР до концентрации 1 мМ. Смесь помещали в стеклянный капилляр (50 мкл). Скорость образования СР определяли по увеличению интенсивности низкочастотной компоненты спектра ЭПР.

Исследованы следующие настройки ЭПР-спектрометра: амплитуда модуляции 1 Гс, мощность микроволнового излучения 20 мВт. ЭПР-спектрометр ER 200D-SRC X-диапазона (Bruker, Германия).

Определение концентрации перекиси водорода. Продукцию перекиси водорода в лимфе определяли методом FOX (ferrous oxidation xylenol orange) [29]. Для этого гемолимфу разбавляли фосфатным буфером в 10 раз, к опытным образцам добавляли 1 мМ NaN_3 для ингибирования эндогенной каталазы, а к контрольным каталазу, 200 ед. акт./мл, вместо NaN_3 . Меланизацию инициировали добавлением 1 мМ ДОФА. Образцы (200 мкл) инкубировали при 28 °С в течение 30 мин, затем к ним добавляли 800 мкл раствора FOX (312.5 мкМ $FeSO_4$, 125 мкМ ксиленоловый оранжевый и 125 мМ сорбитол в 0.3 М $HCl-NaCl$ буфере, pH 1.4), инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Для определения концентрации образовавшейся перекиси измеряли интенсивность оптического поглощения смесей при 560 нм и использовали предварительно полученную калибровочную прямую для перекиси водорода. Оптические измерения проводили на спектрофотометре UV-2401 (PC) CE (Shimadzu, Япония).

Определение концентрации белка. Концентрацию белка в гемолимфе и гомогенатах тканей определяли по методу Бредфорда [30]. Для построения калибровочной кривой использовали БСА.

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали статистически, рассчитывали среднее арифметическое и его ошибку. Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий определяли по критерию Стьюдента с помощью программы STATISTIVA 6.0. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$).

Результаты

Интенсивность инкапсуляции. Анализ толщины оболочки капсулы показал, что уже через 15 мин после внедрения имплантанта происходит образование капсулы толщиной стенки 5.4 ± 1.4 мкм (рис. 1, рис. 2). Через 30 мин толщина стенки достигает значений 6.6 ± 2.01 мкм и в дальнейшем достоверно ($p \leq 0.05$) не изменяется в течение 4 ч (рис. 2). Через 24 ч толщина стенки капсулы составляла 9.2 ± 2.2 мкм

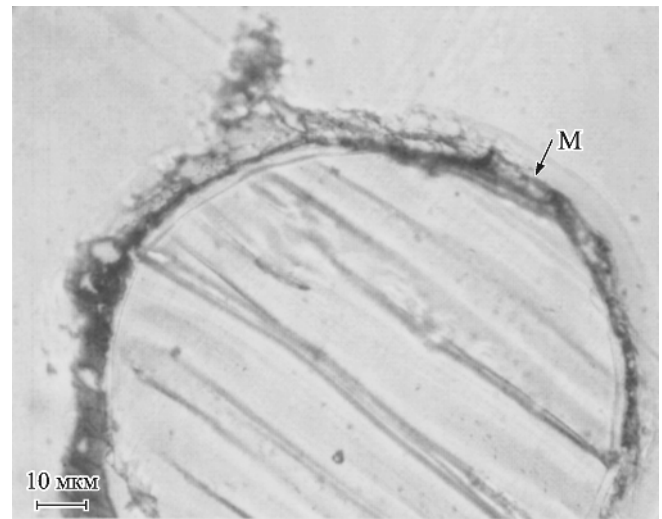


Рис. 1. Поперечный срез нейлонового имплантанта, введенного в гемоцель личинки *G. melonella*.

Стрелкой показано формирование меланиновой капсулы (М) на его поверхности.

и достоверно ($p \leq 0.05$) превышала все предыдущие значения.

Оценка интенсивности потемнения имплантантов показала достоверное увеличение степени меланизации в течение первых четырех часов после внедрения имплантанта. Процесс активно протекал в первые 15 мин инкапсуляции (рис. 3). Интенсивность потемнения увеличивалась в 2—3 раза к 60-й мин по сравнению с интенсивностью инкапсуляции через 15 мин ($p \leq 0.05$; рис. 3); через 4 ч отмечено достоверное ($p \leq 0.05$) 2—3-кратное увеличение по сравнению с первым часом. Следует отметить, что интенсивность потемнения капсулы через 4 ч и 24 ч достоверно не отличалась (рис. 3).

Генерация АКМ при развитии процесса инкапсуляции. При исследовании генерации АКМ

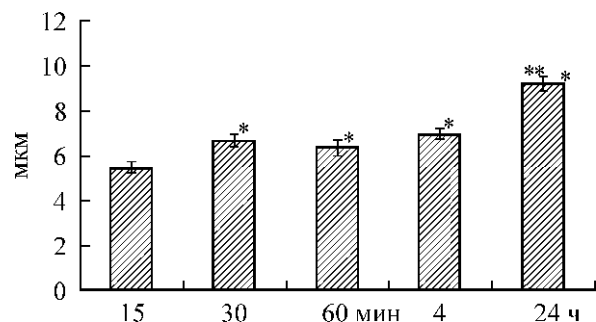


Рис. 2. Толщина меланиновой капсулы (по вертикали, мкм) на поверхности имплантанта при развитии процесса инкапсуляции у личинок *G. melonella* ($n = 25$ для каждого варианта).

Звездочками отмечены: одной — статистическая значимость различий ($p \leq 0.05$) между обозначенными вариантами и вариантом 15 мин; двумя — статистическая значимость различий ($p \leq 0.001$) между обозначенным вариантом и остальными. По горизонтали — время после внедрения имплантанта. (То же для рис. 3—5).

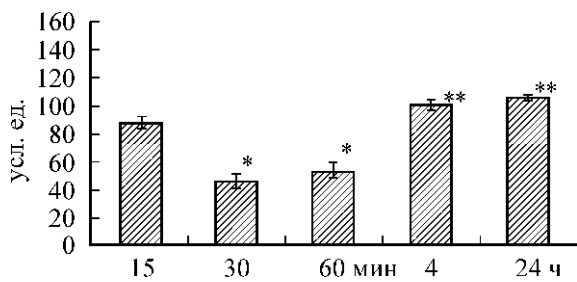


Рис. 3. Интенсивность потемнения имплантанта (по вертикали, усл. ед.) при развитии процесса инкапсуляции у личинок *G. melonella* ($n = 15$ для каждого варианта).

Звездочками отмечены: одной — статистическая значимость различий ($p \leq 0.01$) между обозначенными вариантами и вариантом 15 мин, двумя — статистическая значимость различий ($p \leq 0.01$) между обозначенными вариантами и остальными.

в лимфе насекомого по скорости окисления СРГ было установлено двукратное увеличение генерации АКМ через 15 и 30 мин после внедрения имплантанта ($p \leq 0.05$) (рис. 4). При дальнейшем развитии процесса инкапсуляции скорость генерации АКМ снижалась до значений, достоверно не отличающихся от контроля (нативные насекомые). Анализ образования перекиси водорода в лимфе при развитии инкапсуляции показал схожие тенденции. Концентрация перекиси в лимфе достоверно ($p \leq 0.05$) увеличивалась через 15 мин после внедрения имплантанта (рис. 4). В дальнейшем ее концентрация снижалась до уровня, отмеченного у нативных насекомых (рис. 4).

Активность СОД, каталазы и ГТ при развитии процесса инкапсуляции. При оценке активности антиоксидантов в гемоцитах в процессе инкапсуляции было установлено достоверное снижение активности СОД через 15, 30, 60 мин и 4 ч после внедрения имплантанта (рис. 5, а). Активность внутриклеточной каталазы также достоверно снижалась — в 2.2 раза через 15 мин после начала процесса инкапсуляции (рис. 5, б). Начиная с 30-й мин и до 4-го ч процесса инкапсуляции активность каталазы

была достоверно, в 1.5 раза, ниже контрольных значений (рис. 5, б). Активность глутатион-S-трансферазы резко (в 3 раза) снижалась к 15 мин развития инкапсуляции и сохранялась пониженной в 2 раза в течение 4 ч (рис. 5, в). Через 24 ч после внедрения имплантанта активность СОД, каталазы и глутатион-S-трансферазы достигала контрольных значений (рис. 5).

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс адгезии гемоцитов и меланизация активно протекают уже через 15 мин после внедрения имплантанта в гемоцель через прокол кутикулы (рис. 2, рис. 3). При этом процессы протекают синхронно: прикрепление гемоцитов сопровождается запуском меланогенеза, т. е. образуется меланиновая оболочка. Вероятно, это связано с активацией фенолоксидазы гемоцитов при их распластывании на поверхности чужеродного объекта. В ряде исследований показано увеличение активности фенолоксидазы гемоцитов при их связывании с антигеном за счет активации профенолоксидазной системы [2, 31]. Следует отметить, что толщина капсулы на поверхности имплантанта через 30, 60 мин и 4 ч после его внедрения изменялась незначительно (рис. 2). При этом процесс меланизации капсулы в эти временные отрезки происходил достаточно активно по сравнению с точкой 15 мин после начала инкапсуляции, о чем свидетельствует повышенная меланизация имплантанта через 30, 60 мин и 4 ч (рис. 3). Эти результаты свидетельствуют о том, что наряду с быстрым процессом прикрепления гемоцитов и образованием основной массы капсулы к 15-й мин процесс ее меланизации продолжается в течение 4 ч. Отсутствие изменений в интенсивности потемнения капсулы в промежуток времени между 4 и 24 ч может свидетельствовать о завершении начального этапа интенсивной меланизации капсулы к 4-му ч. При этом анализ толщины капсулы показал ее достоверное (30 %) увели-

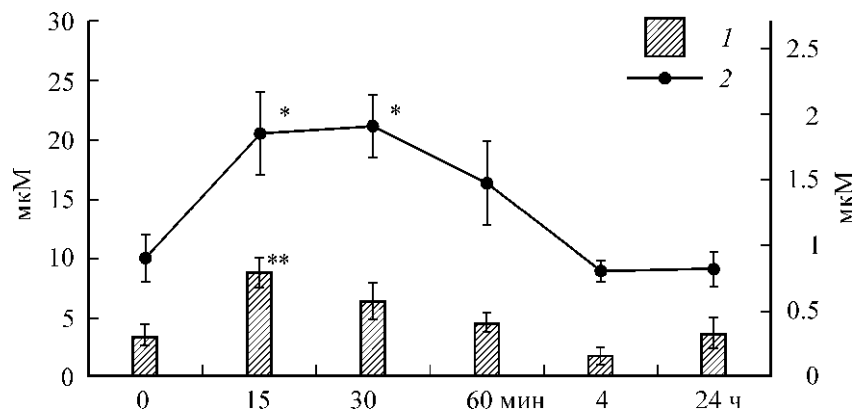


Рис. 4. Концентрация перекиси (по вертикали слева, мкМ, 1) и интенсивность окисления СР-Н (по вертикали справа, мкМ, 2) в гемолимфе при развитии процесса инкапсуляции у личинок *G. melonella* ($n = 15$ для каждого варианта).

Звездочками отмечены: одной — статистическая значимость различий ($p \leq 0.01$) между обозначенными вариантами и вариантами 0.4 ч и 24 ч, двумя — статистическая значимость различий ($p \leq 0.01$) между обозначенным вариантом и вариантами 0—60 мин, 4 и 24 ч.

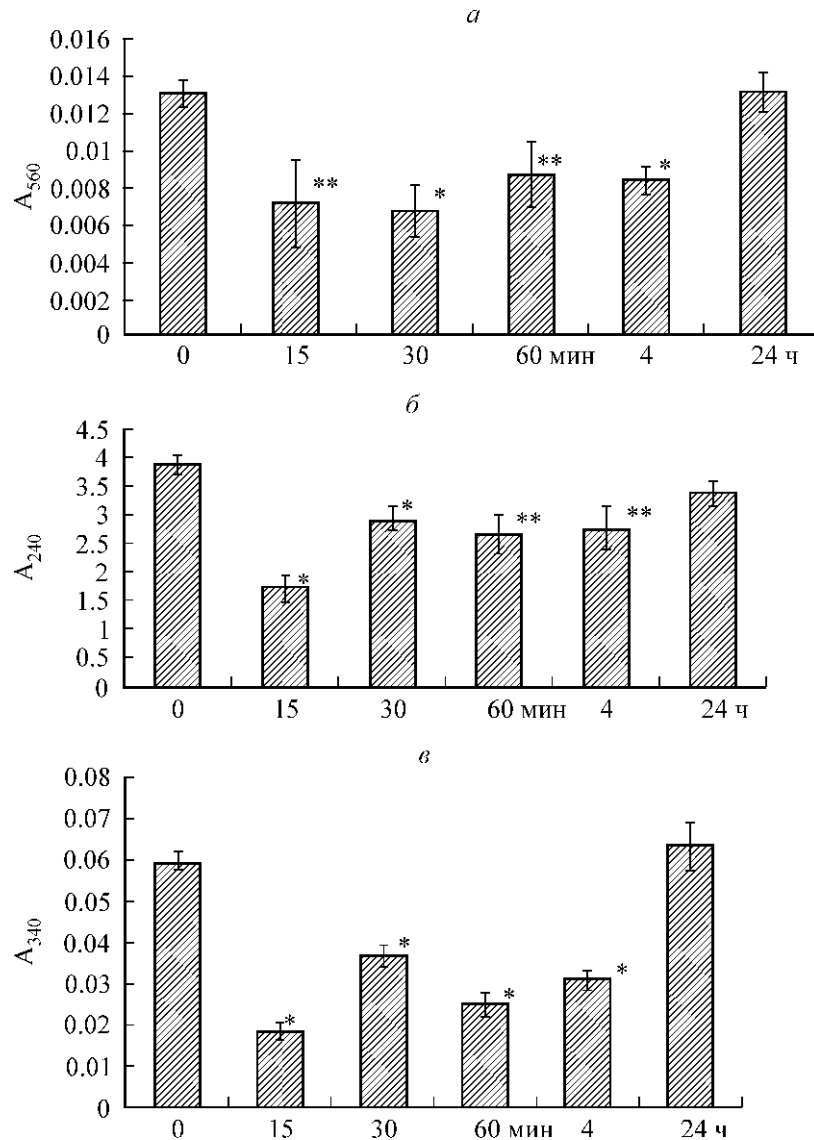


Рис. 5. Активность СОД (а), каталазы (б) и ГТ (в) (по вертикали, А/мин/мг белков) в гемоцитах при развитии процесса инкапсуляции у личинок *G. melonella* ($n = 20$ для каждого варианта).

На а, б звездочками отмечены: одной — статистическая значимость различий ($p \leq 0.001$) между обозначенным вариантом и всеми остальными; двумя — статистическая значимость ($p \leq 0.05$) между обозначенным вариантом и вариантами 0, 30, 60 мин, 4 ч.

На в звездочкой отмечена статистическая значимость различий ($p \leq 0.001$) между обозначенным вариантом и остальными.

чение к 24-му ч по сравнению с 4-часовой точкой (рис. 2). Возможно, данное увеличение происходит за счет прикрепления нативных гемоцитов к поверхности меланизированной капсулы.

При исследовании генерации АКМ в процессе инкапсуляции в лимфе насекомых по скорости окисления зонда СРГ установлено увеличение скорости генерации АКМ через 15 и 30 мин после внедрения имплантата (рис. 4). Также было отмечено увеличение продукции перекиси водорода через 15 мин после начала процесса инкапсуляции (рис. 4). Ранее было установлено, что процесс меланизации сопровождается выбросом АКМ [14, 21, 32], но свидетельства их участия в опосредуемом гемоцитами процессе инкапсуляции были единичны [7, 13]. Полученные нами данные подтвердили, что образование капсулы и ее меланиза-

ция происходят с участием АКМ. Кроме того, отмеченный выброс АКМ в лимфу подтверждает гипотезу о ключевой роли радикалов в уничтожении патогенов при их проникновении в гемоцель [16].

Следует отметить, что процесс меланизации капсулы на имплантате активно протекает в первые часы (рис. 3), при этом было зафиксировано снижение концентрации АКМ к первому часу процесса инкапсуляции (рис. 4). Вероятно, происходит инактивация АКМ в гемолимфе насекомого за счет антиоксидантной системы. В наших исследованиях в гемоцитах личинок воиной моли не было отмечено увеличения активности СОД, каталазы и ГТ при развитии процесса инкапсуляции (рис. 5). Вероятно, контроль за генерацией высокорезактивных АКМ могут выполнять присутствующие в лимфе неферментативные антиок-

сиданты. Известно, что неферментативные антиоксиданты принимают участие в регуляции окислительно-восстановительных процессов в лимфе [13, 33]. Также известны внеклеточные формы антиоксидантных ферментов, которые могут обеспечивать инактивацию супероксид-аниона, перекиси водорода и органических пероксидов [17].

Кроме того, мы наблюдали снижение активности ферментативных антиоксидантов в гемоцитах в течение первых 4 ч после внедрения имплантата (рис. 5). Вероятно, данные изменения являются следствием нарушения окислительно-восстановительного баланса в клетках при активации гемоцитов вследствие развития процесса инкапсуляции. Это предположение согласуется с фактом повышения продукции АКМ в гемоцитах при контакте с антигеном и развитии реакции фагоцитоза [8, 15, 34]. Данные процессы можно сравнить с обнаруженным в клетках крови млекопитающих изменением баланса антиоксиданты—активированные кислородные метаболиты вследствие развития воспалительных реакций при контакте с антигеном [17]. Более того, в ряде случаев при воспалительной реакции фиксируется состояние гранулоцитов, близкое к апоптозу, что является одним из механизмов иммунитета позвоночных [35]. Таким образом, не исключено, что отмеченное нами снижение антиоксидантной активности ферментов в клетках крови насекомого может свидетельствовать о состоянии индуцированного апоптоза и как следствие — повышенной «готовности» гемоцитов к участию в защитных реакциях за счет разрушения и выброса в лимфу различных активаторов иммунных реакций (кальций, хемокинины, активаторы профенолоксидазы и т. д.).

Таким образом, на основе полученных результатов можно предположить, что механизмы процесса инкапсуляции у насекомых позволяют быстро изолировать чужеродный объект за счет образовавшейся капсулы. При этом в процессе меланизации происходит генерация активированных кислородных метаболитов, которые могут участвовать в разрушении проникшего патогена. Вероятно, в организме насекомого существуют механизмы, обеспечивающие локализацию процессе меланизации и генерации АКМ в пределах проникшего инородного объекта. Это, с одной стороны, позволяет в месте проникновения паразита в полной мере использовать высокорекреационные соединения, опосредующие активность клеточного иммунитета, а с другой, — предотвратить дальнейшее увеличение генерации данных неспецифических соединений в лимфе, т. е. предотвратить разрушение собственных тканей организма. Не исключено, что данные функции выполняет антиоксидантная система гемолимфы. И как показали наши исследования, маловероятно, что процесс инактивации АКМ в лимфе контролируется антиоксидантными ферментами гемоцитов. Вероятно, ключевую роль в поддержании окислительно-восстановительного баланса в гемолимфе при развитии процесса инкапсуляции выполняют неферментативные антиоксиданты лимфы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00380), программы «Интеграция» СО РАН (проект 46), Президентского гранта № 02.120.11.484. и Kone Foundation.

Список литературы

- [1] Ratcliffe M. A., Gagen S. J. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella* // *Tissue and Cell*. 1977. V. 9. P. 73—85.
- [2] Lavine M. D., Strand M. R. Insect haemocytes and their role in immunity // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 32. P. 1295—1309.
- [3] Sugumaran M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects // *Pigment Cell Res.* 2002. V. 15. P. 2—9.
- [4] Slepneva I. A., Komarov D. A., Glupov V. V., Serebrov V. V., Khrantsov V. V. Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph of *Galleria mellonella* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 300. P. 188—191.
- [5] Komarov D. A., Slepneva I. A., Dubovskii I. M., Grizanova E. V., Khrantsov V. V. Generation of superoxide radical and hydrogen peroxide in insect hemolymph in the course of immune response // *Doklady Biological Sciences*. 2006. V. 411. P. 482—485.
- [6] Nappi A. J., Vass E. Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster* // *J. Parasitol.* 1998. V. 84. P. 1150—1157.
- [7] Nappi A. J., Vass E., Frey F., Carton Y. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites // *European J. Cell Biol.* 1995. V. 68. P. 450—456.
- [8] Whitten M. M. A., Ratcliffe N. A. In vitro superoxide activity in the haemolymph of the West Indian leaf cockroach. *Blaberus discoidalis* // *J. Insect Physiol.* 1999. V. 45. P. 667—675.
- [9] Nappi A. J., Vass E., Frey F., Carton Y. Nitric Oxide involvement in *Drosophila* immunity // *Nitric Oxide*. 2000. V. 4. P. 423—430.
- [10] Glupov V. V., Slepneva I. A., Serebrov V. V., Khvoshevs-kaya M. F., Martem'yanov V. V., Dubovskii I. M., Khrantsov V. V. Influence of the fungal infection on the production of reactive metabolites and the antioxidant state of haemolymph of *Galleria mellonella* larvae // *Russian Entomol. J.* 2003. V. 12. P. 103—108.
- [11] Лозинская Я. Л., Сленьева И. А., Храмов В. В., Глу-пов В. В. Изменение антиоксидантного статуса и системы генерации свободных радикалов в гемо-лимфе личинок *Galleria mellonella* при микроспори-дозе // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2004. Т. 40. С. 99—103.
- [12] Lan-Mendoza H., Hernandez-Martinez S., Ku-Lope M., Rodriguez-M. D., Herrera-Ortiz A., Rodriguez M. H. Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes // *J. Parasitol.* 2002. V. 88. P. 702—706.
- [13] Kumar S., Cristophides G. K., Cantera R., Charles B., Han Y. S., Meister S., Dimopoulos G., Kafatos F. C., Barrillas-Mury C. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation on *Anopheles gambiae* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 14 139—14 144.
- [14] Nappi A. J., Christensen B. M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate im-

- munity // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 35. P. 443—459.
- [15] *Glupov V. V., Khvoshevskaya M. F., Lozinskaya Ya. L., Dubovskii I. M., Martem'yanov V. V., Sokolova Ju. Ya.* Application of the method NBT-reduction for studies on the production of reactive oxygen species in Insect haemocytes // *Cytobios.* 2001. V. 106. P. 165—178.
- [16] *Carton Y., Poirié M., Nappi A. J.* Insect immune resistance to parasitoids // *Insect Science.* 2008. V. 15. P. 67—87.
- [17] *Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б.* Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М., 2001.
- [18] *Felton G. W., Summers C. B.* Antioxidant systems in insects // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1995. V. 2. P. 187—197.
- [19] *Wang Y., Oberley L. W., Murhammer D. W.* Antioxidant defense systems of two lepidopteran insect cell lines // *Free Radical Biol. Med.* 2001. V. 30. P. 1254—1262.
- [20] *Barbehenn R. V.* Gut-Based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper // *J. Chem. Ecol.* 2002. V. 28. P. 1329—1347.
- [21] *Mastore M., Kohler L., Nappi A. J.* Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine // *Free Radical Res.* 2005. V. 39. P. 853—858.
- [22] *Winterbourn C. C., Pichorner H., Kettle A. J.* Myeloperoxidase-dependent generation of a tyrosine peroxide by neutrophils // *Arch. Biochem. Biophys.* 1997. V. 338. P. 15—21.
- [23] *Rantala M. J., Roff D. A.* Analysis of the importance of genotypic variation, metabolic rate, morphology, sex and development time on immune function in the cricket. *Gryllus firmus* // *J. Evol. Biol.* 2006. V. 19. P. 834—843.
- [24] *Dubovskii I. M., Krukova N. A., Glupov V. V.* Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larvae hemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis* // *J. Invertebr. Pathol.* 2008. V. 98/3. P. 360—362.
- [25] *McCord J. M., Fridovich I.* Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 6049—6055.
- [26] *Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B.* Glutathione-S-transferases // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 7130—7139.
- [27] *Wang Y., Oberley L. W., Murhammer D. W.* Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines // *Free Radical Biol. Med.* 2001. V. 31. P. 1448—1455.
- [28] *Dijalov S., Skatchkov M., Bassenge E.* Spin trapping of superoxide radicals and peroxy-nitrite by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2,2,6-tetramethyl-4-oxopiperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 320. P. 230—237.
- [29] *Jiang Z.-Y., Woollard A. C. S., Wolff S. P.* Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation // *FEBS Lett.* 1990. V. 268. P. 69—71.
- [30] *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248—254.
- [31] *Ling E., Yi X. Q.* Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta* // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 35. P. 1356—1366.
- [32] *Slepneva I. A., Glupov V. V., Sergeeva S. V., Khramtsov V. V.* EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus sibiricus* (Lepidoptera) larvae // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 264. P. 212—215.
- [33] *Oreste A., De Tullio M. C.* Ascorbic acid: much more than just an antioxidant // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1569. P. 1—9.
- [34] *Krishnan N., Hyrš P., Šimek V.* Nitric oxide production by hemocytes of larva and pharate prepupa of *Galleria mellonella* in response to bacterial lipopolysaccharide: Cytoprotective or cytotoxic? // *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 2006. V. 142. P. 103—110.
- [35] *Stoian I., Oros A., Moldoveanu E.* Apoptosis and free radicals // *Biochem. Mol. Med.* 1996. V. 59. P. 93—97.

Поступила 25 XI 2008

GENERATION OF ACTIVATED OXYGEN METABOLITS AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANTS
IN LARVA HEMOLYMPH OF GALLERIA MELLONELLA (L.) (LEPIDOPTERA: PIRALIDAE)
AT DEVELOPMENT OF PROCESS OF INCAPSULATION

© I. M. Dubovskii,* E. V. Grizanova,* E. A. Chertkova,* I. A. Slepneva,** D. A. Komarov,**
Ya. L. Vorontsova* and V. V. Glupov V. V.*

Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;
Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

Activities of enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, and catalase) have been determined in hemocytes and generation of activated oxygen metabolites (AOM) has been studied in lymph of larvae of the wasp moth *Galleria mellonella* at development of the process of incapsulation of nylon implants. It has been established that as soon as 15 min after piercing of cuticle with implant the capsule is formed on its surface. The active melanization of the capsule has been shown to last for 4 h. There have been shown a statistically significant increase of the AOM generation in lymph and a decrease of activities of enzymatic antioxidants in hemocytes of the insects after the implant incorporation. The authors suggest that the key role in maintenance of the oxidation-reduction balance in hemolymph at development of the incapsulation process is played by the lymph non-enzymatic antioxidants.

Key words: insect immunity, cellular immune reactions, activated oxygen metabolites, hemocytes, superoxide dismutase.