ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2015, том 461, № 3, с. 358–361

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 579+573.7

СПОСОБНОСТЬ ГОМОГЕНАТА ЖУКА-ЧЕРНОТЕЛКИ *Alphitobius diaperinus*, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ФИТОНОСИТЕЛЕ, БЛОКИРОВАТЬ РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАРКИНСОНИЗМА

© 2015 г. Н. А. Ушакова, В. М. Ковальзон, А. И. Бастраков, А. А. Козлова, А. В. Ревищин, Г. В. Павлова, академик РАН Д. С. Павлов

Поступило 31.10.2014 г.

DOI: 10.7868/S0869565215090261

Насекомые давно привлекают внимание исследователей как источник биологически активных веществ, присутствующих в тканях различных видов насекомых на различных стадиях их жизненного цикла [1, 2]. Анализ химического состава некоторых видов беспозвоночных показал, что пчела *Apis mellifera*, настоящие саранчовые (семейство Acrididae), домовый сверчок (*Acheta domesticus*), американский таракан (*Periplaneta americana*), личинки и взрослые особи мучного хрущака (*Tenebrio molitor*), личинки восковой моли (*Galleria mellonella*), шелкопряда (*Bombyx mori*), падальной мухи семейства каллифорид (Calliphoridae), черной львинки (*Hermetia illucens*) и др. содержат не только протеины, жиры, но и хитин, минералы, аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты и витамины, эфирные масла, другие биологически активные вещества, включая новые антимикробные пептиды [3–9]. В научной литературе имеются единичные сведения о возможности медицинского применения экстрактов жука-чернотелки *Ulomoides dermestoides* из семейства Tenebrionidae, обладающих противовоспалительным, иммуномодулирующим эффектом [10] и цитотоксичностью по отношению к клеткам А549 опухолей (легочной аденокарциномы) [11]. Близким видом к *Ulomoides dermestoides* является жук *Alphitobius diaperinus*, который также используется в народной медицине для лечения различных заболеваний, в том числе одной из наиболее социально значимых – болезни Паркинсона. Было предположено, что гомогенат биомассы жука *Alphitobius diaperinus* может обладать ингибирующей активностью в отношении токсина МФТП (метилфенилтетрагидропиридин), вызывающего экспериментальный паркинсонизм у мышей линии C57BL/6JSto [12, 13].

Целью настоящей работы было выявление возможности блокирования с помощью препарата из гомогената жука *Alphitobius diaperinus*, иммобилизованного на фитоносителе, развития мышиного паркинсонизма, вызванного введением токсина МФТП.

Гомогенат биомассы взрослого жука-чернотелки *Alphitobius diaperinus* получили с использованием лабораторного блендера Waring 800S (“Waring”, США) и затем иммобилизовали его на специально приготовленном сорбенте. В качестве сорбентра использовали стерильные пищевые пшеничные отруби, увлажненные 1%-м молоком до 50% влажности массы, на поверхности которых молочнокислые бактерии *Enterococcus* и *Leuconostoc* образовали биопленку в процессе твердофазной ферментации отрубей. Образование биопленки контролировали с помощью сканирующего электронного микроскопа MB 2300 (“CamScan”, Чехия). Для этого на покровное стекло ($S = 18 \times 18$ мм^2) помещали каплю изотонического (0.5 М) раствора сахарозы и сверху осторожно насыпали сырую ферментационную массу. Затем стекло высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение суток. Нижнюю часть стекла прикрепляли с помощью двухсторонней проводящей углеродной ленты к поверхности манипуляционного столика. Верхнюю часть покровного стекла напыляли золотом под вакуумом согласно стандартной процедуре приготовления препаратов для электронной сканирующей микроскопии.

Полученный препарат иммобилизованного гомогената жука хранили в холодильнике и ежедневно в течение недели скармливали опытным мышам, для чего его добавляли в кормосмесь путем дробного смешения и тщательного переме-

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской Академии наук, Москва
E-mail: naushakova@gmail.com
Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва

шивания (из расчета 4 г препарата на 1 кг кормовой смеси). Кормосмесь состояла из каши, включающей отваренные овес и горох, с добавлением проса в сыром виде и растительного масла.

Методом весовых аналогов были составлены 3 группы мышей (молодые половозрелые самцы линии C57BL/6JSto, $n = 15$): "К1" – контрольная группа без воздействия (животным не вводили токсин, и они не получали препарат в составе кормосмеси); "К2" – контрольная группа мышей, которым инъецировали токсин, но не давали препарат в составе кормосмеси; "О1" – опытная группа (мыши, в рацион которых вводили препарат и которым была сделана инъекция токсина).

В течение первой недели опыта мыши группы "О1" получали препарат в составе корма. Животные контрольных групп "К1" и "К2" получали аналогичный корм без препарата. Затем животным группы "О1" и группы "К2" был введен подкожно токсин МФТП в дозе 40 мг/кг, после чего в течение последующих двух недель мыши получали такой же корм, как и до инъекции (опытные продолжали получать препарат, контрольные – нет). Мыши "К1" в течение всего опыта получали стандартный рацион вивария без препарата, и этим мышам не вводили токсин. Спустя две недели после введения токсина у мышей всех групп регистрировали изменения массы тела, оценивали координацию движений и физическую выносливость с использованием аппарата "вращающийся стержень" Rota-Rod ("TSE Systems", Швейцария/Германия). Скорость вращения стержня – 6 об./мин, продолжительность экспозиции – 10 мин. Статистическую обработку результатов проводили с помощью методов непараметрической статистики (односторонний дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, критерий Манна–Уитни, критерий знаков).

Поражение головного мозга мышей при развитии паркинсонизма, связанное с разрушением дофаминсодержащих нейронов, оценивали посредством подсчета дофаминергических нейронов, иммуногистохимически окрашенных на ключевой фермент биосинтеза катехоламинов – тирозингидроксилазу (ТГ). Животных усыпляли внутрибрюшинным введением летальной дозы уретана (более 1 г/кг). Кровеносную систему транскардиально перфузировали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7.4, а затем – 4%-м раствором формальдегида в PBS. После дополнительной фиксации в растворе формальдегида в течение 12 ч при +4°C мозг пропитывали 30%-м раствором сахарозы в PBS 24 ч при +4°C. В дальнейшем мозг резали с помощью замораживающего микротома. Фронтальные срезы толщиной 40 мкм, содержащие черную субстанцию, собирали в PBS. Для иммуногистохимического окрашивания каждый 4-й срез помещали в раствор моноклональных мышиных антител против ТГ (T2928 "Sigma", США), разведенных в отношении 1 : 200 в растворе PBS с добавлением 2% нормальной лошадиной сыворотки, 0.3% детергента Тритон X-100 ("Sigma"). В этом растворе срезы содержали при 4–8°C в течение 12 ч при постоянном перемешивании. После промывки в PBS срезы на 1 ч погружали в раствор биотинилированных антител лошади против иммуноглобулина мыши ("Vector Laboratories", США), разведенных PBS в отношении 1 : 100 с добавлением 0.3% Тритон X-100 при комнатной температуре. Затем после трехкратной промывки в PBS срезы помещали в раствор комплекса ABC ("Vector Laboratories") в PBS при разведении 1 : 200 также на 1 ч и проводили стандартную пероксидазную реакцию с помощью 0.03%-го раствора диаминобензидина ("Sigma") в PBS с добавлением 0.01%-й перекиси водорода. Окрашенные срезы помещали на предметные стекла, покрывали 50%-м глицерином и покровным стеклом. Количественный анализ ТГ-позитивных клеток на иммуногистохимически окрашенных срезах проводили с помощью микроскопа

Таблица 1. Результаты ($M \pm SE$) опыта по блокированию развития паркинсонизма у мышей гомогенатом жука *Alphitobius diaperinus*

Показатели	Группа		
	"К1" (контроль)	"К2" (токсин)	"О1" (токсин + антидот)
Масса тела начальная, г	24.0 ± 0.8	26.1 ± 0.1	25.5 ± 0.7
Масса тела через 2 недели после введения токсина, г	26.0 ± 0.9	25.6 ± 1.1	27.1 ± 0.9
Изменение массы тела, г	+2.0**	−0.6	+1.6**
Средний период удерживания на ротароде, мин	>10′ (15/15)*	<10′ (2/12)*	>10′ (13/15)*
% животных, удержавшихся на ротароде более 10′	100**	17	87**
Количество ТГ-позитивных клеток SNpc в срезах мозга	18083 ± 1488**	9704 ± 947	19080 ± 1216**

* – число мышей, продержавшихся >10 мин на ротароде/общее число мышей в выборке (в скобках); ** – $p < 0.05$ при сравнении с группой "К2".

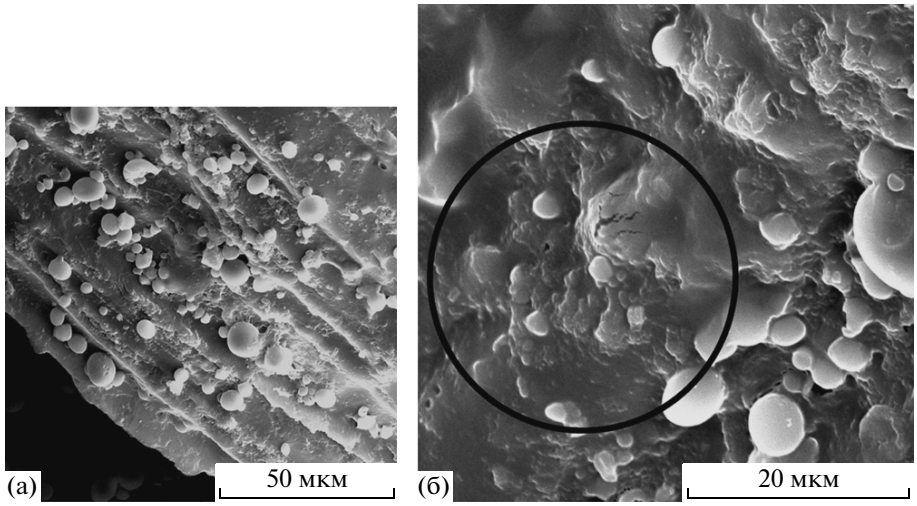

Рис. 1. Структура поверхности фитоносителя. а – сорбированные шарики молочного жира на поверхности отрубей, б – биопленка молочнокислых бактерий на поверхности отрубей (выделено).

Olympus IX81 ("OLYMPUS Corp.", Япония), снабженного моторизованным предметным столиком Märzhäuser motorized stage ("Märzhäuser Wetzlar", Германия), управляемым с помощью компьютера, и цифровой фотокамерой Olympus DP72. Подсчет клеток осуществляли с монитора компьютера с использованием программы "Cell*" (Olympus Soft Imaging Solution GmbH).

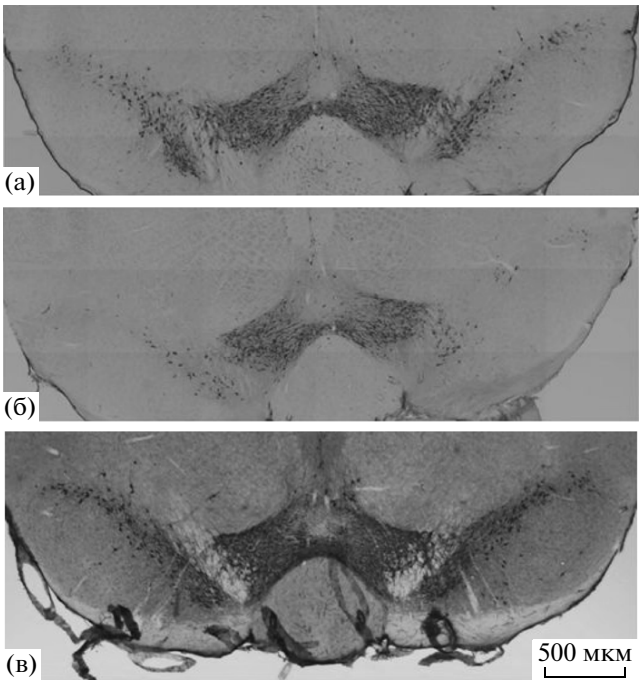

Рис. 2. Поперечный срез головного мозга. а – мыши из контрольной группы "К1". Темным отмечены клетки, содержащие ТГ – фермент, образующий дофамин. В центре микрофотографии – область вентральной покрышки среднего мозга, расходящиеся "крылья" – компактная часть черной субстанции. Та же область головного мозга мыши из группы "К2" (б) и группы "О1" (в) через 2 недели после введения подкожно нейротоксина МФТП.

Электронно-микроскопические исследования структуры примененного сорбента выявили ее уникальность, что связано с образованием сложного рельефа поверхности носителя при твердофазном культивировании молочнокислых бактерий на пшеничных отрубях, увлажненных молоком. Молочный жир находится в молоке в виде жирных шариков диаметром 0.2–10 мкм, окруженных лецитино-белковой оболочкой. Оболочка жирового шарика обладает поверхностной активностью, определяющей способность шариков сорбироваться на частицах отрубей (рис. 1а). Пробиотические бактерии присутствуют в составе биопленки (рис. 1б). Фрагменты жука сорбируются на таком носителе, при этом биологически активные компоненты насекомого, как показал проведенный эксперимент, сохраняют свою физиологическую эффективность.

Результаты опытов на мышах представлены в табл. 1. У 13 из 15 мышей группы "О1" (антидот + токсин) наблюдали сохранение координации движений и физической выносливости в тесте вращающегося стержня, как и у контрольных животных (группа "К1"), которым не был введен токсин. Наоборот, в группе мышей, не получавших с пищей "антидот" в виде специально подготовленного гомогената биомассы *Alphitobius diaperinus*, но получивших токсин (группа "К2"), лишь 2 мыши из 12 сумели продержаться на вращающемся стержне более 10 мин. У мышей группы "О1" так же, как и у животных группы "К1", мы зарегистрировали прирост массы тела, в отличие от животных группы "К2" (токсин), у которых интоксикация вызвала снижение массы тела.

Гистологические исследования выявили уменьшение количества ТГ-содержащих нейронов в компактной зоне черной субстанции (SNpc) у мышей группы “К2” по сравнению с мышами группы “К1” и животными группы “О1”. По данному показателю значения групп “К1” и “О1” достоверно не различались. Полученные результаты указывают на отсутствие поражения дофаминсодержащих нейронов головного мозга мышей группы “О1”, получавших антидот и токсин, характерного для развития паркинсонизма (рис. 2).

Таким образом, иммобилизованный на фитоносителе гомогенат жука *Alphitobius diaperinus* продемонстрировал выраженную способность нейтрализовывать действие на мышей токсина МФТП, моделирующее паркинсонизм. Возможно, что этот эффект связан с ингибированием фермента моноаминоксидаза В [13].

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий”, проект № 45-П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Корпачев В.В.* Целебная фауна. М.: Наука, 1989. 189 с.
2. *Овсепян А., Венедиктова Н.И., Захарченко М.В., Казаков Р.Е., Кондрашова М.Н., Литвинова Е.Г., Саакян И.Р., Сирота Т.В., Ставровская И.Г., Шварцбург П.М.* // Вестн. новых мед. технологий. Электронное издание. 2010. № 1, 2 с.
3. *Finke M.D.* // Zoo Biology. 2002. V. 21. P. 269–285.
4. *Бакулин А.В., Велешко И.Е., Румянцева Е.В., Левов А.Н., Бурмистрова Л.А., Хисматуллин Р.Г., Курченко В.П., Варламов В.П., Кривцов Н.И.* // Докл. РАСХН. 2011. № 5. С. 48–52.
5. *Diener S., Zurbrügg C., Roa Gutiérrez F., Nguyen Dang Hong, Morel A., Koottatep T., Tockner K.* II Intern. Conf. on Solid Waste Management in the Developing Countries. Khulua, 2011. P. 52–59.
6. *Van Huis A., Van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., Vantomme P.* Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security. Rome: FAO, 2013. 171 p.
7. *Elwert C., Knips I., Katz P.* XI Symp. on Pig and Poultry Nutrition. Wittenberg, 2010. P. 140–142.
8. *Lamberty M., Ades S., Uttenweiler-Joseph S., Brookhart G., Bushey D., Hoffmann J.A., Bulet P.* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 14. P. 9320–9326.
9. *Mak P., Chmiel D., Gasek G.J.* // Acta biohim. pol. 2001. V. 48. № 4. P. 1191–1195.
10. *Santos R.C., Lunardelli A., Caberlon E., Bastos C.M., Nunes F.B., Pires M.G.* // Inflammation. 2010. V. 33. № 3. P. 173–179.
11. *Crespo R., Villaverde M.L., Girotti J.R., Güerci A., Juárez M.P., de Bravo M.G.* // J. Ethnopharmacol. 2011. V. 136. № 1. P. 204–209.
12. *Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V.* // Neuroscience. 2011. V. 181. P. 175–188.
13. *Ковальзон В.М., Завалко И.М.* // Нейрохимия. 2013. Т. 30. № 3. С. 193–206.