

УДК 57.044:577.151.042

ВЛИЯНИЕ ДИЭТИЛМАЛЕАТА НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ ИМАГО *Musca domestica* L.¹

© 2022 г. А. Г. Кинарейкина¹, Е. А. Силиванова^{1,*}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал ТюмНЦ СО РАН

625517 Тюменская обл., Тюменский р-н, с. Мальково, ул. Мира, 5, Россия

*E-mail: sylvanovaea@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 10.08.2022 г.

Принята к публикации 15.09.2022 г.

Диэтилмалеат (DEM) – синергист инсектицидных соединений, который применяют при изучении механизмов инсектицидной устойчивости насекомых. Оценена гибель самок и самцов комнатной мухи *Musca domestica* L. после топикального нанесения DEM в разных дозах (0.2–5.0 мкг/особь), а также активность глутатион-S-трансферазы (GST) у выживших особей через 1 и 48 ч после обработки. Доза DEM, не приводившая к гибели насекомых, составила 0.2 и 0.5 мкг/особь для самцов и самок соответственно. Топикальное нанесение DEM в дозе 2 мкг/особь не приводило к статистически значимому изменению активности GST у самок и самцов *Musca domestica* L. по сравнению с контрольными особями, при этом гибель насекомых не превышала допустимый уровень (5%). Использование DEM в качестве ингибитора GST в дозе 5 мкг/особь, вызывавшей 10–30%-ную гибель *M. domestica* обоего пола, может не приводить к угнетению активности целевого фермента у самок в отличие от самцов.

Ключевые слова: синергисты инсектицидов, ингибиторы, ферменты детоксикации, самки, самцы, комнатная муха.

DOI: 10.31857/S0002188122120079

ВВЕДЕНИЕ

Синергисты инсектицидов – это химические вещества, которые при использовании их в сублетальных концентрациях способны значительно повышать токсичность инсектицида для насекомых [1, 2]. Синергисты могут улучшать проникновение, транспортировку или доступность инсектицида, выступать в качестве суррогатных субстратов или ингибиторов ферментов детоксикации и белков-транспортеров, изменяя тем самым ответную реакцию насекомого на пестицид [1, 2]. Синергисты представляют коммерческий интерес, поскольку их сочетание с инсектицидами повышает эффективность последних, что помогает свести использование пестицидов к минимуму и

является полезным в преодолении инсектицидной резистентности насекомых [2]. Синергисты, обладающие активностью в отношении специфических ферментных систем детоксикации, используют для изучения механизмов устойчивости к инсектицидам и определения конкретных метаболических путей [3].

Диэтилмалеат (Diethyl maleate, **DEM**) является синергистом, который обычно используют в качестве ингибитора глутатион-S-трансфераз (**GSTs**, КФ 2.5.1.18) насекомых для выявления метаболической устойчивости или для повышения эффективности инсектицидов [3–7]. Глутатион-S-трансферазы представляют семейство ферментов II фазы детоксикации, которые катализируют реакцию с восстановленным глутатионом (**GSH**) и конъюгируют ксенобиотические соединения через сульфгидрильную группу, образуя более растворимое соединение, которое может выводиться из организма [8]. DEM способен конъюгировать GSH, что снижает способность GSTs использовать его для конъюгации с инсектицидами

¹ Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований РАН (№ 121042000076-5 “Разработка методов научно-обоснованного применения средств дезинсекции, химической и биологической регуляции численности паразитов с целью сохранения эпизоотического благополучия и качества здоровья сельскохозяйственных и непродуктивных животных, пчел и птиц”), запланированных во ВНИИВЭА-филиале ТюмНЦ СО РАН на 2021–2023 гг.

или с продуктами окислительного стресса, который они вызывают [9].

Как правило, синергистические соединения применяют в концентрациях и дозах, которые не приводят или приводят к очень низкой смертности насекомых, но являются достаточно высокими для достижения максимального ингибирования целевых ферментов детоксикации [2]. Диапазон концентраций DEM, используемых при изучении механизмов резистентности, довольно широк и составляет от 0.96 [10] до 25–50 мкг/особь [7, 11] для разных видов насекомых. В опубликованных исследованиях механизмов инсектицидной устойчивости комнатной мухи *Musca domestica* (вид, который является модельным при тестировании инсектицидов) приведены разные дозы DEM для взрослых особей: 1 мкг/самка [5, 6], 7 мкг/самка [12], 10 мкг/самка [13], 40 мкг/особь [9]. Однако крайне мало работ, демонстрирующих ингибирование GSTs в организме насекомых под воздействием DEM [14]. Цель работы – оценка влияния диэтилмалеата на активность глутатион-S-трансферазы самок и самцов *Musca domestica* при его топикальном нанесении.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были самки и самцы 3–5-суточного возраста лабораторной линии *Musca domestica* L., содержащейся в стандартных условиях [15]. В предварительных экспериментах методом топикального нанесения устанавливали дозу синергиста, не приводящую к гибели насекомых. На вентральную часть грудного отдела насекомых наносили ацетоновые растворы DEM в объеме 1 мкл. Всего было протестировано 5 доз DEM в диапазоне 0.2–5.0 мкг/особь. В контроле особей обрабатывали 1 мкл ацетона. Затем насекомых помещали в стеклянные стаканчики, снабженные поилками с 5%-ным раствором глюкозы. Учет гибели насекомых проводили через 24 и 48 ч.

Для оценки влияния DEM на активность GST из групп контрольных и обработанных синергистом насекомых отбирали часть особей (по 5–10 самок и самцов для каждой дозы) через 1 ч и 48 ч после обработки (использовали только выживших насекомых) и до исследования хранили при –80°C. Из каждой особи готовили гомогенаты в 0.1 М фосфатном буфере pH 7.6, содержащем 1 мМ DTE, 1 мМ EDTA, 1 мМ PTU, 1 мМ PMSF. Активность GST и содержание белка определяли в супернатантах сразу после центрифугирования (10000 g, 2 мин). Содержание белка в гомогенатах определяли по методу Лоури, используя бычий

сывороточный альбумин в качестве стандарта. Определение активности GST проводили в 96-луночных микропланшетах (MiniMed, Россия) на микропланшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия) с использованием синтетического субстрата 1-хлор-2,4-динитробензена при длине волны 340 нм в течение 20 мин в режиме кинетика [15]. Удельную активность фермента рассчитывали с учетом неферментативного преобразования субстрата, фактора разведения гомогената и содержания белка в пробе и выражали как изменение оптической плотности за 1 мин на мг белка ($\Delta OD/\text{мин}/\text{мг}$ белка). Статистический анализ результатов определения активности фермента проводили с использованием ANOVA и критерия Тьюки для множественных сравнений с помощью пакета программ Statistica 13.3 (StatSoft, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Литературные сведения о дозе диэтилмалеата, применяемой в исследованиях на *M. domestica* разнятся [5, 6, 9, 12, 13], поэтому в предварительных экспериментах оценили смертность имаго при воздействии разными дозами синергиста. Согласно представленным в табл. 1 данным, при обработке взрослых особей *M. domestica* DEM нулевая гибель среди самцов отмечена при использовании дозы 0.2, среди самок – 0.2 и 0.5 мкг/особь. При обработке насекомых DEM в дозе до 2 мкг/особь включительно отмечали допустимый уровень гибели (до 5%) как среди самок, так и среди самцов. Нанесение DEM в дозе 5 мкг/особь приводило к увеличению смертности до 10% среди самок и до 30% среди самцов.

К сожалению, в научной литературе скудно представлены результаты исследований по влиянию разных доз синергистов на активность ферментов детоксикации у насекомых. В частности, в работе [14] изучали влияние DEM в концентрациях, не вызывающих гибель насекомых, на активность GST у 6-ти видов насекомых и обнаружили, что степень ингибирования фермента варьировалась от 18 до 48% в зависимости от вида. Согласно этим исследованиям, увеличение дозы DEM сопровождалось незначительным повышением или снижением степени ингибирования GST у отдельных видов насекомых [14]. Полученные нами результаты определения активности GST у самок и самцов *M. domestica* через 1 ч и 48 ч после топикального нанесения разных доз DEM представлены на рис. 1. Статистический анализ полученных данных не выявил значимого варьирования активности фермента между группами

Таблица 1. Гибель имаго *Musca domestica* через 24 и 48 ч после топикального нанесения диэтилмалеата (DEM)

Доза DEM, мкг/особь	Самки			Самцы		
	число особей в опыте, экз.	число погибших особей, экз. (абс. %)		число особей в опыте, экз.	число погибших особей, экз. (абс. %)	
		через 24 ч	через 48 ч		через 24 ч	через 48 ч
0 (контроль)	80	0 (0%)	1 (1.25%)	75	1 (1.33%)	1 (1.33%)
0.2	50	0 (0%)	0 (0%)	50	0 (0%)	0 (0%)
0.5	40	0 (0%)	0 (0%)	40	2 (5%)	2 (5%)
1	50	0 (0%)	1 (2%)	60	3 (5%)	3 (5%)
2	60	1 (1.7%)	1 (1.7%)	80	2 (2.5%)	2 (2.5%)
5	30	2 (6.7%)	3 (10%)	30	7 (23%)	9 (30%)

самок, обработанных разными дозами синергиста, через 1 ч после обработки. Напротив, варьирование активности GST между группами самцов в такой же период времени после нанесения тех же доз DEM было статистически значимым ($p < 0.001$). Статистически значимого варьирования ферментативной активности как между группами самок, так и между группами самцов через 48 ч после обработки DEM не обнаружено ($p = 0.260$ и $p = 0.0998$ соответственно). Выявлено снижение активности GST у самцов в 1.70 ($p = 0.0016$) и 1.40 ($p = 0.271$) раза через 1 ч и 48 ч соответственно после воздействия DEM в дозе 5 мкг/особь по сравнению с активностью у контрольных особей. Отмеченное угнетение активности GST у самцов через 1 ч после обработки дозой 5 мкг/особь и частичное восстановление активности фермента через 48 ч, вероятно, были связаны с изменением уровня восстановленного глутатиона. Действительно, в опытах на самцах *M. domestica* обнаружили, что нанесение DEM в дозе 40 мкг/особь приводило к снижению содержания глутатиона [9]. Максимальное снижение (до 50% от начального уровня) авторы отмечали через 2 ч, а значительное, но не полное восстановление через 8 ч после обработки [9].

Наблюдала статистически значимые ($p < 0.05$) отличия в активности GST между самками и самцами в контроле и в группе особей, обработанных DEM в дозе 5 мкг/особь (через 1 ч после обработки): у самцов ферментативная активность была соответственно в 1.29 и в 1.98 раза ниже, чем у самок. Выявленные отличия в активности GST по полу в контрольной группе согласовались с литературными сведениями, согласно которым на протяжении имагинальной стадии *M. domestica*

активность GST у самок почти в 2 раза выше, чем у самцов [8].

Проведенные ранее исследования показали, что DEM способен увеличивать токсичность инсектицидов для особей резистентных линий насекомых [7, 11], однако это не всегда бывает так [4, 10]. Что касается *M. domestica*, синергизм DEM по отношению к имидаклоприду наблюдали при использовании дозы 1 мкг/особь в опытах с самками 4-суточного возраста имидаклоприд-резистентной линии [5, 6]. В то время как в исследовании [13] применение DEM не оказало влияния на токсичность спиносада для *M. domestica* резистентной линии при нанесении синергиста на самок 4–6-суточного возраста в дозе 10 мкг/особь. Общепринято, что DEM выступает как ингибитор GSTs, и наблюдаемый синергистический эффект свидетельствует о возможном вкладе GSTs в формирование инсектицидной устойчивости [5–7, 11]. Отсутствие синергизма объясняют тем, что формирование резистентности происходит по механизму нечувствительности мишени к инсектициду вследствие мутаций (например, kdr-мутации в случае пиретроидов) либо тем, что GSTs не принимают участия в метаболизме данного инсектицида [4, 10, 13]. Следует отметить, что в упомянутых выше работах не приведены сведения об активности GST или других ферментов детоксикации у насекомых после обработки DEM. Согласно нашему исследованию, топикальное нанесение DEM в дозе 1 и 2 мкг/особь не сопровождалось статистически значимым изменением активности GST у имаго *M. domestica* лабораторной линии. Полученные результаты демонстрируют также, что использование DEM в качестве ингибитора GST в дозе 5 мкг/особь, вызывавшей 10–30%-ную гибель *M. domestica* обоего пола, мо-

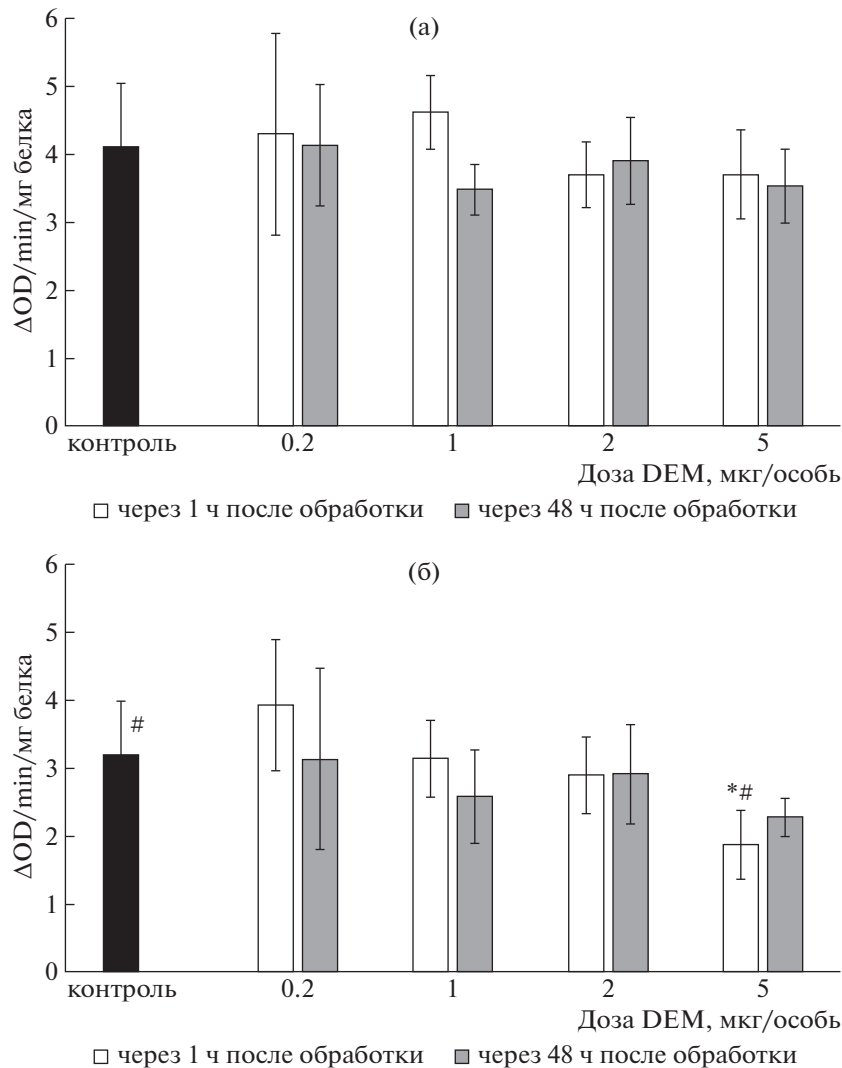


Рис. 1. Активность глутатион-S-трансферазы у самок (а) и самцов (б) *Musca domestica* лабораторной культуры через 1 ч и 48 ч после топикального нанесения диэтилмалеата (DEM) в разных дозах. * Статистически значимо относительно контрольных особей, $p < 0.01$, ** статистически значимо относительно самок аналогичной группы, $p < 0.05$.

жет не приводит к угнетению активности целевого фермента у самок в отличие от самцов. Учитывая полученные результаты и литературные данные, считаем, что для уточнения механизма синергистического действия DEM в отношении инсектицидов необходимы дополнительные исследования по оценке его влияния на активность GST и других ферментов детоксикации у насекомых.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синергисты являются важным инструментом для исследований инсектицидной устойчивости насекомых и находят широкое применение при разработке инсектицидных препаратов. Доза синергиста диэтилмалеата, при топикальном нанесении вызывавшая не более 5% гибели имаго

Musca domestica, составила 2 $\mu\text{g}/\text{особь}$. Однако при воздействии данной дозы DEM не обнаружено статистически значимого изменения активности GST ни у самок, ни у самцов по сравнению с контрольными особями. Применение более высокой дозы DEM (5 $\mu\text{g}/\text{особь}$) приводило к увеличению смертности насекомых и только у самцов сопровождалось угнетением активности GST через 1 ч после обработки синергистом. У выживших особей (как самок, так и самцов) не отмечено статистически значимого снижения активности GST через 48 ч после нанесения DEM (5 $\mu\text{g}/\text{особь}$). Обнаруженные особенности изменения активности одного из ферментов детоксикации у самок и самцов *M. domestica* в ответ на воздействие синергистом DEM необходимо учитывать при проведении исследований на данном виде насекомых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bbernard C., Philogene B.J.R. Insecticide synergists – role, importance, and perspectives // J. Toxicol. Environ. Health. 1993. V. 38 (2). P. 199–223.
2. Snoeck S., Greenhalgh R., Tirry L., Clark R.M., Van Leeuwen T., Dermauw W. The effect of insecticide synergist treatment on genome-wide gene expression in a polyphagous pest // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 13440.
3. Еремина О.Ю. Синергисты как инструмент энтомотоксикологических исследований: исследование ферментных систем комнатных мух *Musca domestica* L. Сообщ. 1 // Прикл. энтомол. 2011. № 1. С. 27–37.
4. Еремина О.Ю., Олифер В.В., Лопатина Ю.В. Механизмы резистентности к циперметрину и фипронилю у рыжего таракана *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Ectobiidae) // Мед. паразитол. и паразитар. болезни. 2019. № 2. С. 37–47.
5. Li J., Wang Q., Zhang L., Gao X. Characterization of imidacloprid resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) // Pest. Biochem. Physiol. 2012. V.102 (2). P. 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.10.012>
6. Ma Z., Li J., Zhang Y., Shan C., Gao X.W. Inheritance mode and mechanisms of resistance to imidacloprid in the house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from China // PLOS ONE. 2017. V. 12 (12). № 0189343.
7. Gonzalez-Morales M.A., Romero A. Effect of synergists on deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae) // J. Economic Entomol. 2019. V. 112 (2). V. 786–791.
8. Clark A.G. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms // Comp. Biochem. Physiol. 1989. V. 92 (3). V. 419–46.
9. Wang W., Mo J.C., Cheng J.A., Zhuang P.J., Tang Z.H. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) // Pest. Biochem. Physiol. 2006. V. 84 (3). P. 180–187.
10. Pang S., You W.Y., Duan L.S., Song X.Y., Li X.F., Wang C.J. Resistance selection and mechanisms of oriental tobacco budworm (*Helicoverpa assulta* Guenee) to indoxacarb // Pest. Biochem. Physiol. 2012. V. 103 (3). P. 219–223.
11. Ahmadi E., Khajehali J., Rameshgar F. Evaluation of resistance to permethrin, cypermethrin and deltamethrin in different populations of *Musca domestica* (L.), collected from the Iranian dairy cattle farms // J. Asia-Pacific Entomol. 2020. V. 23 (2). P. 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.01.014>
12. Shono T., Scott J.G. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1 // Pest. Biochem. Physiol. 2003. V. 75 (1–2). P. 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00011-7)
13. Welling W., de Vries J.W. Synergism of organophosphorus insecticides by diethyl maleate and related compounds in house flies // Pest. Biochem. Physiol. 1985. V. 23 (3). P. 358–369. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(85\)90097-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(85)90097-5)
14. Wu G., Miyata T., Kang C. Y., Xie L. H. Insecticide toxicity and synergism by enzyme inhibitors in 18 species of pest insect and natural enemies in crucifer vegetable crops // Pest. Manag. Sci. 2007. V. 63 (5). P. 500–510.
15. Силиванова Е.А., Шумилова П.А., Левченко М.А. Активность ферментов детоксикации у имаго комнатной мухи *Musca domestica* L. при селекции хлорфенапиром // Биомика. 2020. Т. 12. № 4. С. 492–503.

Effect of Diethylmaleate on the Activity of Dlutathione-S-Transferase Imago *Musca domestica* L.

A. G. Kinareikina^a and E. A. Silivanova^{a, #}

^aThe All-Russian Research Institute of Veterinary Entomology and Arachnology – Branch of the Tyumen Scientific Research Center SB RAS
ul. Mira 5, Tyumen region, Tyumen district, s. Malkovo 625517, Russia

[#]E-mail: silivanovaea@mail.ru

Diethylmaleate (DEM) is a synergist of insecticidal compounds, which is used in the study of the mechanisms of insecticidal resistance of insects. The death of females and males of the housefly *Musca domestica* L. after topical application of DEM in different doses (0.2–5.0 mcg/individual), as well as the activity of glutathione-S-transferase (GST) in surviving individuals 1 and 48 hours after treatment, was evaluated. The dose of DEM, which did not lead to the death of insects, was 0.2 and 0.5 micrograms/individual for males and females, respectively. Topical application of DEM at a dose of 2 mcg/individual did not lead to a statistically significant change in GST activity in females and males of *Musca domestica* L. compared with the control individuals, the death of insects did not exceed the permissible level (5%). The use of DEM as a GST inhibitor at a dose of 5 mcg/individual, which caused 10–30% death of *M. domestica* of both sexes, may not lead to inhibition of the activity of the target enzyme in females, unlike males.

Key words: insecticide synergists, inhibitors, detoxification enzymes, females, males, housefly.