

УДК 577.117; 541.515; 678.048

ОММОХРОМЫ СЛОЖНОГО ГЛАЗА НАСЕКОМЫХ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ*

© 2020 А.Е. Донцов¹, Н.Л. Сакина¹, М.А. Яковлева¹, А.И. Бастратов², И.Г. Бастрова³,
А.А. Загоринский⁴, Н.А. Ушакова², Т.Б. Фельдман^{1,5}, М.А. Островский^{1,5**}

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
119334 Москва, Россия; электронная почта: ostrovsky3535@mail.ru

² ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071 Москва, Россия

³ ФБУ ВНИИ лесоводства и механизации лесного хозяйства, 141200 Пушкино, Московская обл., Россия

⁴ ФБУ Рослесозащита, 141202 Пушкино, Московская обл., Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.04.2020

После доработки 05.05.2020

Принята к публикации 08.05.2020

Цель работы — скрининг и сравнительное исследование антиоксидантных свойств оммохромов сложного глаза насекомых. Оммохромы были выделены в препаративных количествах из насекомых пяти различных семейств: Stratiomyidae, Sphingidae, Blaberidae, Acrididae и Tenebrionidae. Количественный выход оммохромов в зависимости от вида насекомого составил 0,9–5,4% сухого веса пигмента от влажного веса исходного сырья. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии был проведен качественный анализ всех изолированных оммохромов. Показано, что эти пигменты представляют собой смесь нескольких оммохромов омматинового типа. Оммохромы, выделенные из всех перечисленных видов животных, проявляют выраженную флуоресценцию с максимумами эмиссии в области 435–450 нм и 520–535 нм, причем интенсивность эмиссионного максимума значительно возрастает при окислении оммохромов пероксидом водорода. Установлено, что оммохромы имеют стабильный сигнал ЭПР, представляющий собой синглетную линию с величиной $g = 2,0045\text{--}2,0048$, шириной 1,20–1,27 мТ и высокой концентрацией парамагнитных центров ($> 10^{17}$ спин/г сухого веса). Все исследованные оммохромы проявляют высокую антирадикальную активность, измеряемую по степени тушения хемилюминесценции в модельной системе окисления, содержащей люминол, гемоглобин и пероксид водорода. Оммохромы проявляли высокую ингибирующую активность в отношении пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток, индуцированную видимым светом в присутствии в качестве сенситизатора липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека, а также в отношении железо-аскорбат-индуцированной пероксидации липидов. Полученные результаты важны как для понимания биологической функции оммохромов у беспозвоночных, так и для выявления тех видов беспозвоночных, оммохромы которых можно было бы наиболее эффективно использовать как фармакологические препараты, главным образом, для предотвращения и лечения патологий, связанных с развитием окислительного стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оммохромы, насекомые, ЭПР спектрометрия, флуоресценция, антиоксидантная активность.

DOI: 10.31857/S0320972520060044

ВВЕДЕНИЕ

Оммохромы — природные пигменты беспозвоночных животных. Характерная особенность этих пигментов — наличие в структуре феноксазинового/фенотиазинового колец. Оммохромы подразделяют на две основных подгруппы — ом-

матины и оммины, представляющие собой димеры или олигомеры производных кинуренина соответственно [1, 2]. Омматины и оммины *in vivo* — темноокрашенные пигменты, как правило, желто-коричневого или пурпурного цвета. Насекомые используют оммохромы для окраски различных частей тела, для мимикрии. Так, на-

Принятые сокращения: УФ — ультрафиолет; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ЭПР — электронный парамагнитный резонанс; ТБК — тиобарбитуровая кислота.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-084, 29.05.2020.

** Адресат для корреспонденции.

пример, было показано, что ксантомматин и его производные (такие как омматин D) ответственны за цвет и его изменения у членистоногих [3–5]. Значительные количества оммохромов содержатся в сложном глазу членистоногих, где они находятся в высокой концентрации и выполняют важную функцию. Так, ранее было нами показано, что концентрация оммохромов в глазу креветки-опоссум *Mysis relicta* достигает 80 мг сухого веса на 1 мл или 200 мкг сухого веса на 1 мг белка [6]. Сложный глаз большинства членистоногих состоит из множества небольших глазков (омматидиев), каждый со своими фоторецепторными клетками (рабдомами). Во всех органах зрения, наряду со светочувствительными ретиналь-содержащими зрительными пигментами, присутствуют и не светочувствительные экранирующие пигменты оммохромы. Их главная функция в сложных глазах оптическая – светофильтрующая и светопоглощающая [7, 8]. Оммохромы участвуют в формировании спектральной чувствительности глаза, поглощая или пропуская свет в определенных областях спектра. Кроме того, поглощая рассеянный свет, они повышают контрастность и четкость изображения.

Наряду с оптической, оммохромы выполняют также защитную, антиоксидантную функцию [9–12]. Эта защита необходима в связи с тем, что кванты света, особенно в фиолетовой и синей областях спектра, высокоэнергетичны. Вследствие этого они представляют потенциальную опасность для структур глаза, особенно для фоторецепторных клеток сетчатки (т.н. «Blue Light Hazard»). Опасность фотоповреждения структур глаза насекомых имеет свои особенности. Во-первых, в условиях длительной световой экспозиции в ретинальных клетках глаза насекомых, в отличие от позвоночных животных, могут накапливаться фагосомы [13], содержащие большое количество ненасыщенных жирнокислотных остатков, легко подверженных процессу перекисидации. Во-вторых, оптические среды глаза многих насекомых пропускают УФ-облучение, которое является активным экзогенным прооксидантным фактором. В таких условиях облучение УФ- и интенсивным видимым светом может приводить к появлению токсичных продуктов перекисидации, которые способны проникать в мембраны рабдома и повреждать их. Поэтому вероятность фотоповреждения в омматидии сложного глаза, по всей видимости, более высока, чем в глазах позвоночных животных. Вследствие этого наличие дополнительной защиты клеток сложного глаза от прооксидантных факторов жизненно необходимо. Роль такой защиты в глазах членистоно-

гих могут выполнять оммохромы. Известно, что те виды ракообразных и насекомых, которые содержат большие количества экранирующих пигментов, крайне устойчивы к прооксидантным факторам [6, 10, 14]. Причем для ракообразных на примере креветки *M. relicta* нами было показано, что эффект этой устойчивости клеток сложного глаза к действию прооксидантных факторов не связан с более высоким содержанием в них низкомолекулярных антиоксидантов и антиоксидантных ферментов, а обусловлен именно наличием большого количества гранул, содержащих оммохромы [14].

Оммохромы могут быть как донорами, так и акцепторами электронов и функционировать как эффективные антирадикальные молекулы [15–17]. Одним из механизмов защитного действия оммохромов от фотоповреждения зрительных клеток может быть их реакция с синглетным молекулярным кислородом, чрезвычайно токсичным для клетки оксидантом. Нами ранее было показано, что оммохромы глаза креветки *Pandalus latirostris* тушат фотосенсибилизированную люминесценцию синглетного кислорода [18]. В то же время не исключено, что оммохромы могут быть и генераторами синглетного кислорода. Такая возможность показана, например, для кинуренина – предшественника биосинтеза оммохромов [19–21]. Однако данных по фотовозбуждению оммохромов, образованию триплета и генерации синглетного кислорода в литературе нет. Скорее всего оммохромы лишь тушители синглетного кислорода.

В настоящее время общепринято, что антиоксидантная активность оммохромов обусловлена их способностью нейтрализовать активные формы кислорода и связывать ионы металлов переменной валентности в неактивные комплексы [9, 11]. Ранее нами было показано, что оммохромы мухи черная львинка *Hermetia illucens* способны тушить хемилюминесценцию люминола, индуцированную пероксидом водорода в присутствии гемоглобина [12]. Величина константы тушения хемилюминесценции оммохромами мухи черная львинка ($> 10^4 \text{ M}^{-1}$) [22] сопоставима с аналогичными константами для синтетических антиоксидантов, таких как мексидол и производные гидроксид(алкокси)-2-аминобензотиазола [23].

Различные членистоногие, такие как ракообразные и насекомые, являются хорошим источником природных биологически активных пигментов оммохромов. Эти природные антиоксиданты могут быть использованы в практических целях, например, в фармакологии. Цель настоящей работы – получение оммохромов из различных кормовых насекомых и исследова-

ние их физико-химических характеристик и антиоксидантных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение оммохромов из голов насекомых. Оммохромы были получены из пяти видов насекомых. Муха «черная львинка» (*Hermetia illucens*, семейство Stratiomyidae) и ее личинки широко используются для питания сельскохозяйственных животных и конвертации биологических отходов в доступный источник пищевого белка, жиров, хитина и меланина. Чистая культура этих мух содержится в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова (ИПЭЭ РАН). Технология культивирования мух включает следующие стадии: содержание взрослых мух в инсектарии в контролируемых условиях; инкубация яиц и получение личинок в инкубаторе; выращивание личинок в контейнере с питательным субстратом; получение предкуколок, затем куколок и имаго. Взрослые мухи живут 5–8 дней. Нуклеотидная последовательность *Hermetia illucens* зарегистрирована в Генном банке (*Hermetia illucens*, sample H-il 1 No. KY817115). После окончания жизненного цикла подмор мух замораживали и хранили при температуре -180°C .

Жук чернотелка (большой мучной хрущак) (*Tenebrio molitor*, семейство Tenebrionidae) в настоящее время является одним из самых популярных видов кормовых насекомых, которых используют для кормления различных экзотических животных. Существуют крупные производства в Европе, Китае, США. Культура содержится в лабораторных условиях ИПЭЭ РАН.

Таракан мраморный (*Nauphoeta cinerea*, семейство Blaberidae) — также популярный вид кормовых насекомых для насекомоядных животных. Культура содержится в лабораторных условиях ИПЭЭ РАН.

Бабочка табачный бражник (*Manduca sexta*, семейство Sphingidae). Гусеницы этой бабочки служат популярным кормом для насекомоядных экзотических животных. Культура содержится в энтомологическом отделе Московского зоопарка.

Саранча пустынная (*Schistocerca gregaria*, семейство Acrididae) — вид кормовых насекомых для насекомоядных животных. Пользуется популярностью как живой корм для насекомоядных животных. Культура содержится в энтомологическом отделе Московского зоопарка.

Экстракция оммохромов из голов насекомых была выполнена без их предварительной гомогенизации. Головы взрослых умерших насе-

комых были отделены вручную и хранились при температуре -180°C . При необходимости головы насекомых были предварительно проинкубированы в нейтральном метаноле в соотношении ~10 г голов на 300 мл метанола в течение суток (в темноте), при комнатной температуре и периодическом перемешивании. После фильтрации 500 мл абсолютного метанола, содержащего 1% по объему хлористого водорода (MeOH-HCl смесь), был добавлен к массе голов, и смесь инкубировали при 6°C в темноте, в течение 48 ч при периодическом встряхивании. После этого экстракт фильтровали через бумажный фильтр (Ватман, Grade 6). Полученный супернатант вишневого цвета нейтрализовали 20%-ным раствором аммиака и центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин. Супернатант удаляли, к осадку добавляли свежий раствор MeOH-HCl до его полного растворения. Процедуру осаждения оммохромов раствором аммиака повторяли дважды. Окончательно осадок оммохромов высушивали в эксикаторе в темноте, в присутствии безводного хлорида кальция.

Выделение липофусциновых гранул. Липофусциновые гранулы выделяли из клеток ретиального пигментного эпителия (РПЭ) кадаверных глаз доноров разных возрастов с помощью модифицированной методики, предложенной Boulton и Marshall [24]. Кадаверные глаза человека были получены по договору из Глазного тканевого банка ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Изолированные липофусциновые гранулы промывали 0,1 М К-фосфатным буфером, pH 7,6, после чего ресуспендировали в фосфатном буфере и хранили в морозильной камере при -20°C . Концентрацию гранул подсчитывали, используя камеру Горяева.

Получение наружных сегментов фоторецепторов быка. Наружные сегменты фоторецепторных клеток были выделены из сетчаток глаз быка модифицированным методом, предложенным Mc Dowell [25]. Полученные наружные сегменты были суспендированы в 0,1 М К-фосфатном буфере и хранились при температуре -20°C .

Получение кардиолипиновых липосом. Кардиолипиновые липосомы были получены путем суспендирования кардиолипина в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,4. В эксперименте использовали натриевую соль кардиолипина («Sigma-Aldrich», США) в метанольном растворе. Раствор кардиолипина (5 мг/мл) испаряли на ротаторном испарителе, липидную пленку сольбилизировали в фосфатном буфере и тщательно перемешивали на мешалке типа «Vortex». Суспензию липосом хранили при температуре $2-4^{\circ}\text{C}$.

Анализ экстрактов оммохромов. Оммохромы анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе фирмы «Knauer» (Германия) с колонкой «Диасфер 120 C18» (4 x 250 мм, размер частиц сорбента 5 мкм). Растворитель А — 10%-ный ацетонитрил + 90% воды (+ 0,5% муравьиной кислоты). Растворитель Б — 100%-ный ацетонитрил (+ 0,5% муравьиной кислоты). Разделение осуществляли путем линейного градиентного элюирования в системе: от 100% растворителя А до 60% растворителя А и 40% растворителя Б за 60 мин, скорость потока 0,4 мл/мин. Температура колонки 24 °С. Продукты хроматографического разделения измеряли с помощью фотометрического детектора «Knauer K-2501», а также флуориметрического детектора (RF-10A-xl, «Shimadzu»). Образец оммохромов или стандарта растворяли в 100 мкл смеси метанола с 0,5%-ной HCl. Для работы использовали готовые стандарты: триптофан, кинуренин, 3-гидроксикинуренин, ксантуреновая кислота фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Ксантомматин был синтезирован путем автоокисления из 3-гидроксикинуренина, согласно методике, описанной в [26]. Спектры оптического поглощения измеряли на спектрофотометре «Shimadzu UV-1601PC» (Япония). Спектры флуоресценции регистрировали на флуориметре «Shimadzu RF-5301PC» (Япония). Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение RFPC версия 2.0 («Shimadzu»).

Измерение концентрации свободно радикальных центров. Параметры парамагнитных центров в оммохромах определяли методом спектрометрии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Для этого использовали либо сухие образцы оммохромов, либо их замороженные суспензии в К-фосфатном буфере, которые готовили с помощью насадки из полиэтиленовой трубочки длиной 10–15 мм и внутренним диаметром 0,45 мм. На каждую пробу отбирали суспензию оммохромов объемом 0,3 мл и быстро замораживали в жидком азоте (–196 °С). Образцы сохраняли в замороженном виде до момента измерения. Для измерения спектров ЭПР из трубочки поршнем выдавливали замороженный столбик образца. Регистрацию спектров ЭПР образцов проводили при 77°K на радиоспектрометре ЭПР «Bruker EMX» (Германия) в цилиндрическом резонаторе. Условия записи спектров ЭПР: ΔH развертка — 50 Гс; H центр — 3440 Гс; амплитуда модуляции — 3 Гс, мощность СВЧ — 20 мкВт. Эталон для определения концентрации спинов — УДА №5, сертификат о калибровке № 905/910-2012.

Окисление оммохромов пероксидом водорода.

Окислительная деструкция оммохромов была вызвана 1,0–1,5% пероксидом водорода. Суспензию пигментов (2–3 мг/мл) в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,4, или раствор оммохромов в MeOH-HCl (0,5–1,0 мг/мл) инкубировали в присутствии пероксида водорода не менее 2 ч. После этого сравнивали физико-химические характеристики исходного и окисленного образцов.

Определение антиоксидантной активности оммохромов. Антирадикальную активность полученных оммохромов определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемилюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [27]. В качестве измеряемых параметров был взят латентный период достижения максимальной интенсивности свечения. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu RF 5301PC» (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре. Для количественной оценки способности оммохромов взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе данной модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах зависимости латентного периода от концентрации пигмента. Среда для инкубации содержала 0,05 М К-фосфатный буфер, pH 7,4, 2,0 мкМ гемоглобина, 100 мкМ люминола, 100 мкМ ЭДТА, и различные концентрации оммохромов в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,4 или в растворе метанол-HCl. Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода. В качестве контроля использовали буферный раствор без оммохромов.

Кинетику пероксидации липидов кардиолипидных липосом или наружных сегментов фоторецепторных клеток определяли по накоплению продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты) [28]. Процесс пероксидации липидов индуцировали либо ионами двухвалентного железа, либо видимым светом в присутствии липофусциновых гранул. Для облучения полным видимым светом использовали галогенную лампу КГМ 24-150, снабженную фокусирующей системой и тепловым фильтром. Энергия облучения составляла 80 мВт/см². Спектральная область облучения 390–700 нм. Облучение проводили, как правило, при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Среднюю скорость накопления ТБК-активных продуктов рассчитывали, измеряя концентрацию продуктов, образовавшихся через 10, 25 и 40 мин после начала реакции.

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0.05$). Данные были выражены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все изученные насекомые содержали высокие концентрации оммохромов, которые экстрагировали из голов насекомых с довольно высокими выходами. Выход оммохромов в % сухого веса пигмента от влажного веса исходного сырья составил 0,9, 1,4, 1,7, 4,2 и 4,8% для мраморного таракана, пустынной саранчи, бабочки бражник табачный, мухи черная львинка и жука чернотелки соответственно. Максимумы спектров поглощения оммохромов всех изученных насекомых в видимой области спектра находились в диапазоне от 430 нм до 502 нм (рис. 1).

Наиболее длинноволновые максимумы поглощения были характерны для оммохромов бабочки бражник табачный (502 нм, рис. 1, *а*) и мраморного таракана (497 нм, рис. 1, *д*). Оммохромы жука чернотелки имели выраженный максимум поглощения при 454 нм (рис. 1, *в*). Менее выраженный, но самый коротковолновый максимум поглощения имели оммохромы мухи черная львинка — 430 нм (рис. 1, *б*). Оммохромы саранчи пустынной не показывали выраженного максимума поглощения в видимой области спектра, демонстрируя лишь «плечо» в области 490 нм (рис. 1, *г*). Характер спектров поглощения оммохромов не изменялся при независимых выделениях из одного источника (3–4 независимых выделения). Это связано, по-видимому, с тем, что условия культивирования насекомых на протяжении эксперимента не изменялись. Максимумы поглощения оммохромов при 430–490 нм характерны для класса омматинов, а максимумы поглощения при 520 нм и выше характерны для омминов [1]. Абсорбционные спектры оммохромов мухи черная львинка, жука чернотелки и пустынной саранчи более характерны для спектров омматинов; абсорбционные спектры мраморного таракана и бабочки бражник табачный имеют промежуточный характер, что может быть связано с наличием у них двух типов оммохромов — омматинов и омминов.

Все изолированные оммохромы интенсивно флуоресцировали в видимой области спектра. Наблюдалось два основных пика флуоресценции — коротковолновый с максимумом эмиссии при 440 нм и длинноволновый с максимумом эмиссии при 530 нм (рис. 2, *а* и рис. 2, *б* соответственно).

Основные максимумы возбуждения коротковолновой флуоресценции оммохромов были 290 нм, 330 нм и 380 нм, а длинноволновой флуоресценции — 330 нм и 460 нм.

Исследование качественного состава оммохромов было выполнено методом ВЭЖХ. На рис. 3 приведены хроматограммы всех изученных оммохромов, измеренных по поглощению при длине волны 490 нм и по интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 460 нм и эмиссии 520 нм.

Состав оммохромов был различен для разных видов насекомых (рис. 3). Оммохромы представляли собой смесь нескольких веществ, главным образом, смесь ксантомматина и нескольких его производных. Оммохромы мраморного таракана довольно сильно отличаются по составу от остальных представителей класса насекомых (рис. 3, *д*). Оммохромы бабочки бражник табачный и мухи черная львинка (рис. 3, *а* и *б*) близки между собой по составу веществ, детектируемых как по поглощающим, так и по флуоресцирующим компонентам. Однако оммохромы бабочки табачный бражник в отличие от оммохромов мухи черная львинка, возможно, содержат в своем составе омматин D с максимумом поглощения 490 нм, что согласуется с данными работы [30], в которой омматин D в смеси с ксантомматином был найден как хромофор оммохром-связывающего белка в гемолимфе бабочки бражник табачный. Жук чернотелка по составу оммохромов скорее ближе к бабочке и мухе, чем к мраморному таракану (рис. 3, *в*). Важно отметить, что оммохромы большинства изученных насекомых имеют максимум поглощения близкий к максимуму поглощения омматинов. Однако полный качественный состав оммохромов в глазах изучаемых насекомых требует дальнейшего исследования, возможно, с использованием масс-спектрометрического анализа.

Все исследованные оммохромы имели выраженный синглетный сигнал ЭПР (рис. 4).

Параметры сигнала ЭПР оммохромов из всех пяти видов насекомых приведены в таблице. Видно, что все оммохромы имеют *g* факторы близкие к *g* фактору свободного электрона и довольно высокое содержание парамагнитных центров. Наибольшая концентрация спинов, отнесенная на грамм сухого веса, была у оммохромов мухи и бабочки ($>10^{18}$).

Оммохромы остальных насекомых имели концентрацию парамагнитных центров меньше, чем 10^{18} , причем концентрация спинов оммохромов пустынной саранчи и жука чернотелки была более чем на порядок ниже, чем у мухи черная львинка. Высокая концентрация стабильных свободно радикальных центров позволяет рас-

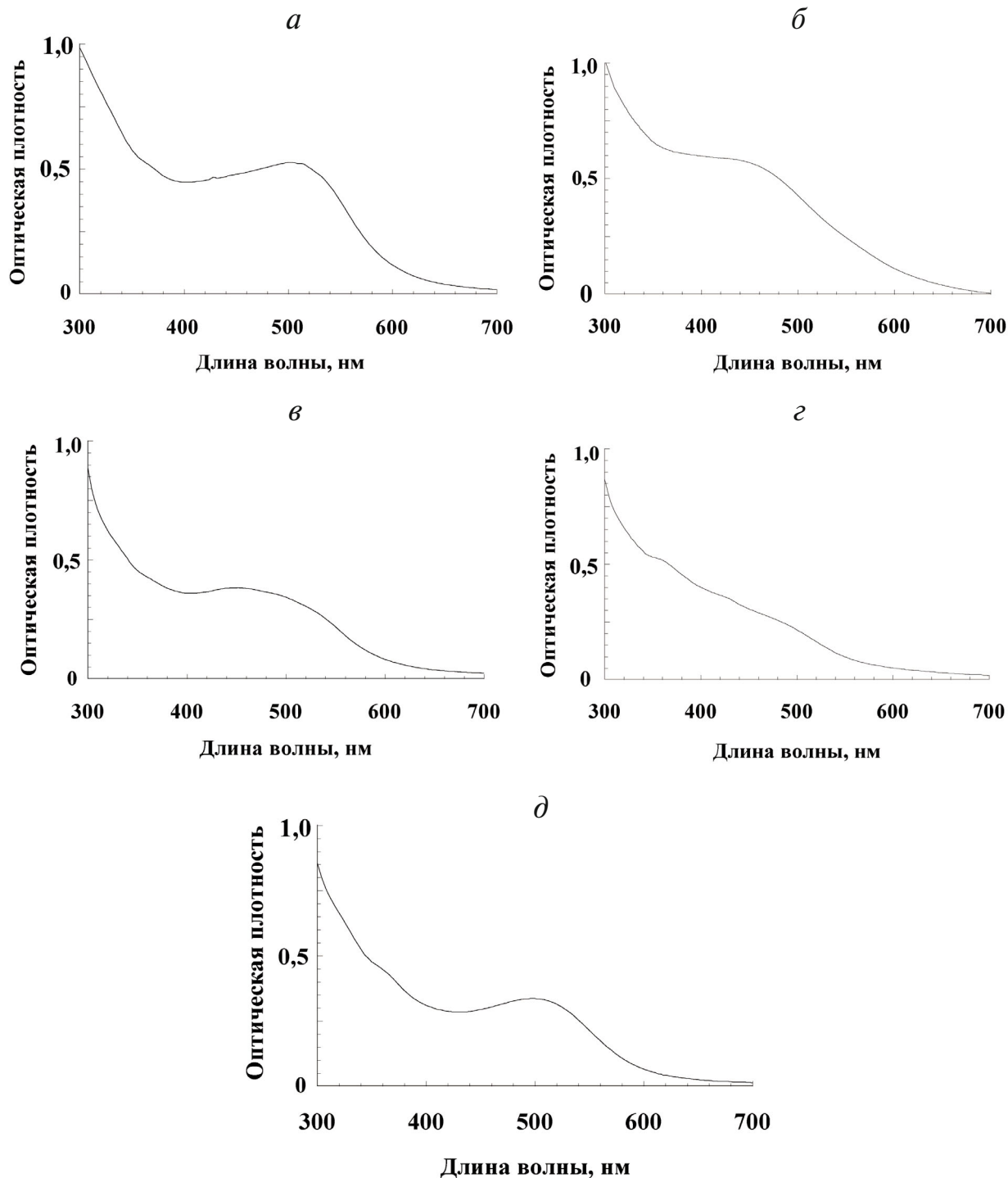


Рис. 1. Спектры поглощения оммохромов насекомых в метанол-НСL. *a* – Бабочка бражник табачный; *б* – муха черная львинка; *в* – жук чернотелка; *г* – саранча пустынная; *д* – таракан мраморный. Концентрация оммохромов была 0,4–0,6 мг/мл

смагивать оммохромы как сборщики («мусор-щипки») активных свободных радикалов. Величина g фактора оммохромов, находящаяся в интервале между 2,004 и 2,005 (таблица), характерна для феноксирадикалов [31]. Известно, что интермедиаты феноксазина, который входит в

структуру молекулы оммохромов, проявляют стабильный сигнал ЭПР [32, 33] и могут, по-видимому, обуславливать сигнал ЭПР, обнаруженный нами у оммохромов насекомых. Более того, не исключено, что именно феноксазин и определяет антирадикальную активность оммохромов

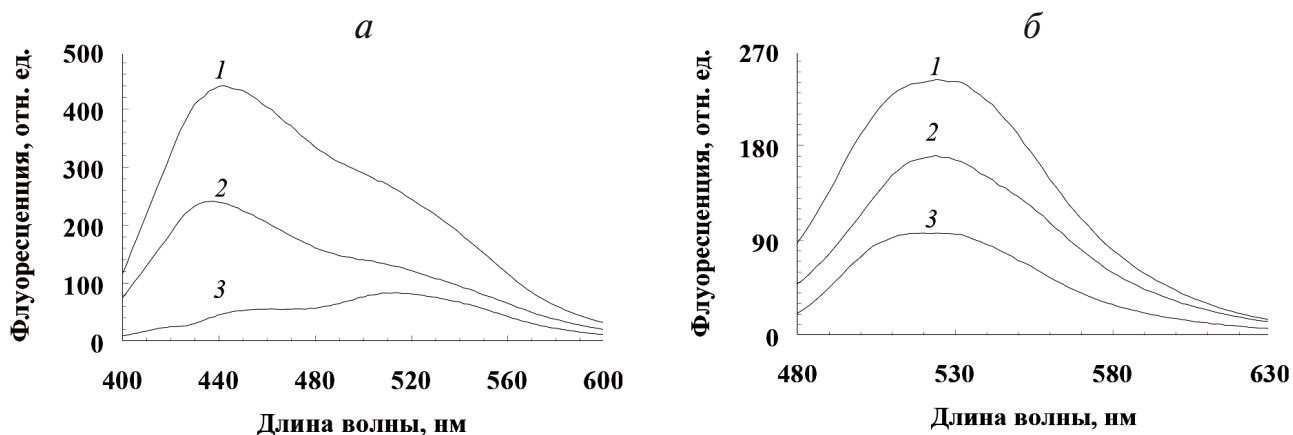


Рис. 2. Спектры флуоресценции оммохромов пустынной саранчи (1), бабочки бражник табачный (2) и мраморного таракана (3) в метанол-НСl. Длина волны возбуждения составляла: а – 380 нм и б – 460 нм

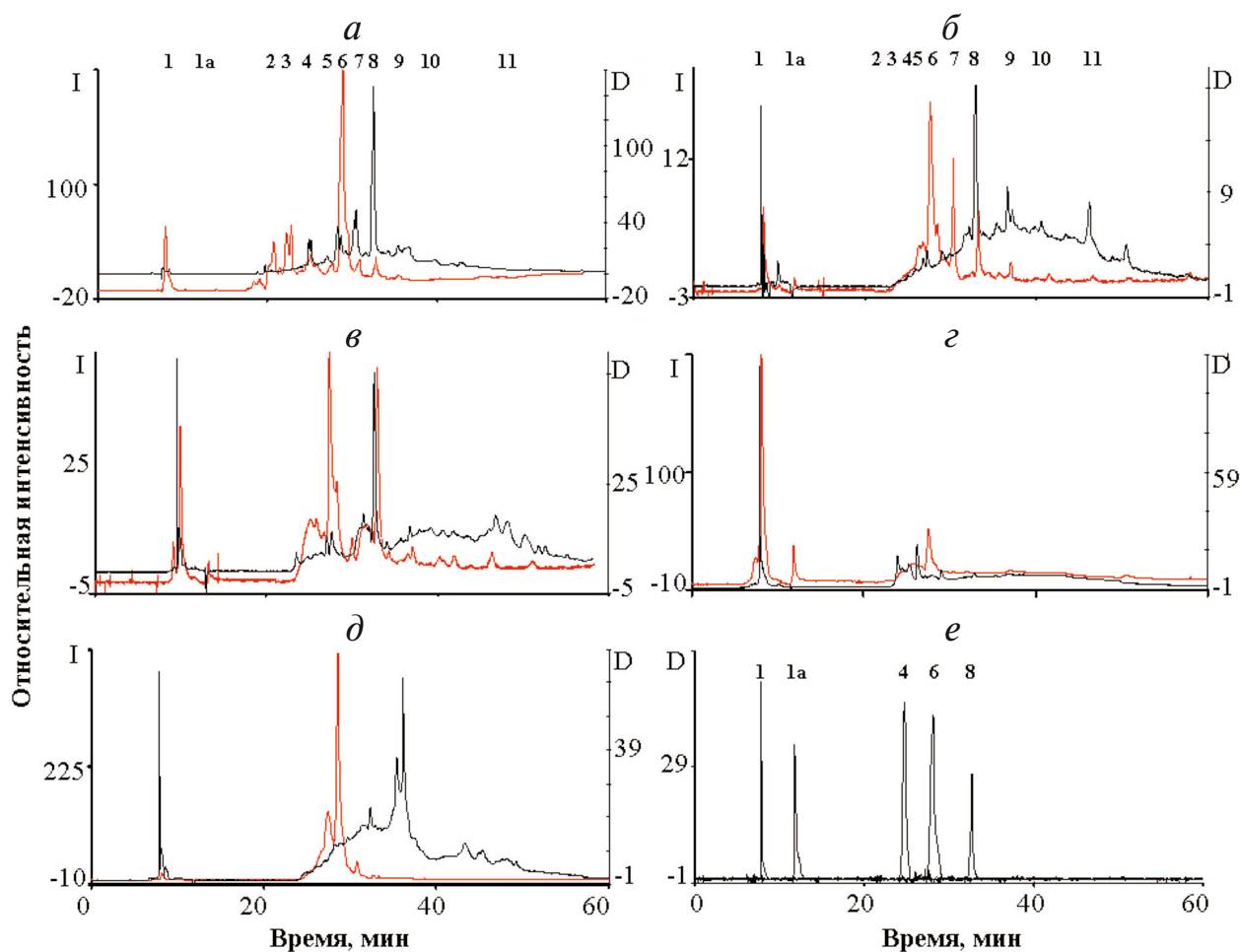


Рис. 3. ВЭЖХ анализ экстрактов оммохромов из глаз насекомых различных видов. а – Бабочка бражник табачный; б – муха черная львинка; в – жук чернотелка; г – саранча пустынная; д – таракан мраморный; е – панель разделения стандартных веществ. Детектирование по поглощению на длине волны 490 нм (хроматограмма черного цвета). Детектирование флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны 460 нм (хроматограмма красного цвета). Пики: 1–3-гидроксикинурунин, 1а – кинурунин, 4 – триптофан, 5 – предположительно дигидроксантомматин [29], 6 – ксантуреновая кислота, 7 – предположительно декарбоксилированный ксантомматин [29], 8 – ксантомматин. Для хроматограмм с детектированием по поглощению (D) и по флуоресценции (I) показаны отдельные оси ординат. (С цветными вариантами рис. 3 и 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohshm/>)

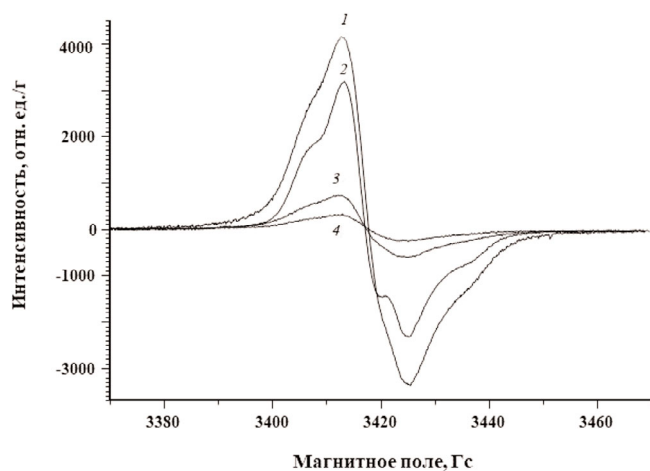


Рис. 4. Спектры ЭПР оммохромов мухи черная львинка (1), бабочки бражник табачный (2), мраморного таракана (3) и пустынной саранчи (4). Регистрацию спектров проводили, используя сухие образцы препаратов оммохромов при комнатной температуре

[17]. Сигнал ЭПР оммохромов был чувствителен к облучению как УФ, так и видимым светом при температуре жидкого азота (на рис. не показано). При облучении оммохромов интенсивность исходного сигнала ЭПР значительно возрастала.

Оммохромы оказались чувствительными к окислению пероксидом водорода и/или надпероксидом калия. Окисление пероксидом водорода приводило к исчезновению длинноволнового максимума поглощения в области 430–502 нм (рис. 5, а, кривая 1) и появлению коротковолнового максимума в области 370–390 нм (рис. 5, а, кривая 2). Это свидетельствует о том, что изолированные оммохромы находились, главным образом, в восстановленном состоянии. Действие пероксида водорода имеет, как минимум, двухфазный характер. Сначала наблюдается переход оммохромов в окисленную форму, а затем при длительной инкубации с окислителем, по-видимому, происходит постепенное разрушение пиг-

мента, сопровождающееся дальнейшим уменьшением абсорбции пигментов в видимой области спектра (рис. 5, а) и значительной потерей количества парамагнитных центров.

Флуоресцентные свойства оммохромов также претерпевали изменения при окислении оммохромов пероксидом водорода. На рисунке 5, б видно, что при окислении происходит значительный рост интенсивности флуоресценции исследуемых образцов, главным образом, в длинноволновой области спектра (500–600 нм).

ВЭЖХ анализ оммохромов показал заметные качественные и количественные изменения в их составе после окисления пероксидом водорода (рис. 5, в–е). Видно, что пики 2–8, присутствующие в исходном не окисленном образце, после воздействия пероксидом водорода практически исчезают. Одновременно увеличивается содержание пиков 9–11, имеющих значительную флуоресценцию. Однако для окончательного выяснения причин увеличения интенсивности флуоресценции оммохромов при окислении пероксидом водорода необходимы дополнительные исследования.

Сигнал ЭПР оммохромов также оказался чувствительным к действию пероксида водорода (рис. 5, ж, кривые 1 и 2). Окисление оммохромов пероксидом водорода приводило к резкому падению сигнала ЭПР и, в конечном счете, к полной потере парамагнетизма, что вероятно связано с разрушением феноксаинового кольца в структуре молекул оммохромов [17], исходно проявляющего свободнорадикальные свойства. Деструкция оммохромов из глаза дрозофилы пероксидом водорода была показана ранее [34].

Оммохромы в относительно невысоких концентрациях тушат хемилюминесценцию люминола, инициируемую пероксидом водорода. На рис. 6, а показана кинетика хемилюминесценции люминола в присутствии различных концентраций оммохромов мраморного таракана. В присутствии оммохромов наблюдается как па-

Параметры сигнала ЭПР оммохромов насекомых

Образец	Оммохромы, порошок, комнатная температура				
	бабочка бражник табачный	муха черная львинка	саранча пустынная	таракан мраморный	жук чернотелка
Параметры сигнала ЭПР					
g-фактор	2,0048	2,0045	2,0045	2,0046	2,0045
Полуширина линии, ΔH_{pp}	12,0	12,4	12,6	12,7	10,2
Концентрация парамагнитных центров, спин/г сухого вещества	$27,5 \times 10^{17}$	$48,0 \times 10^{17}$	$4,6 \times 10^{17}$	$9,7 \times 10^{17}$	$0,5 \times 10^{17}$

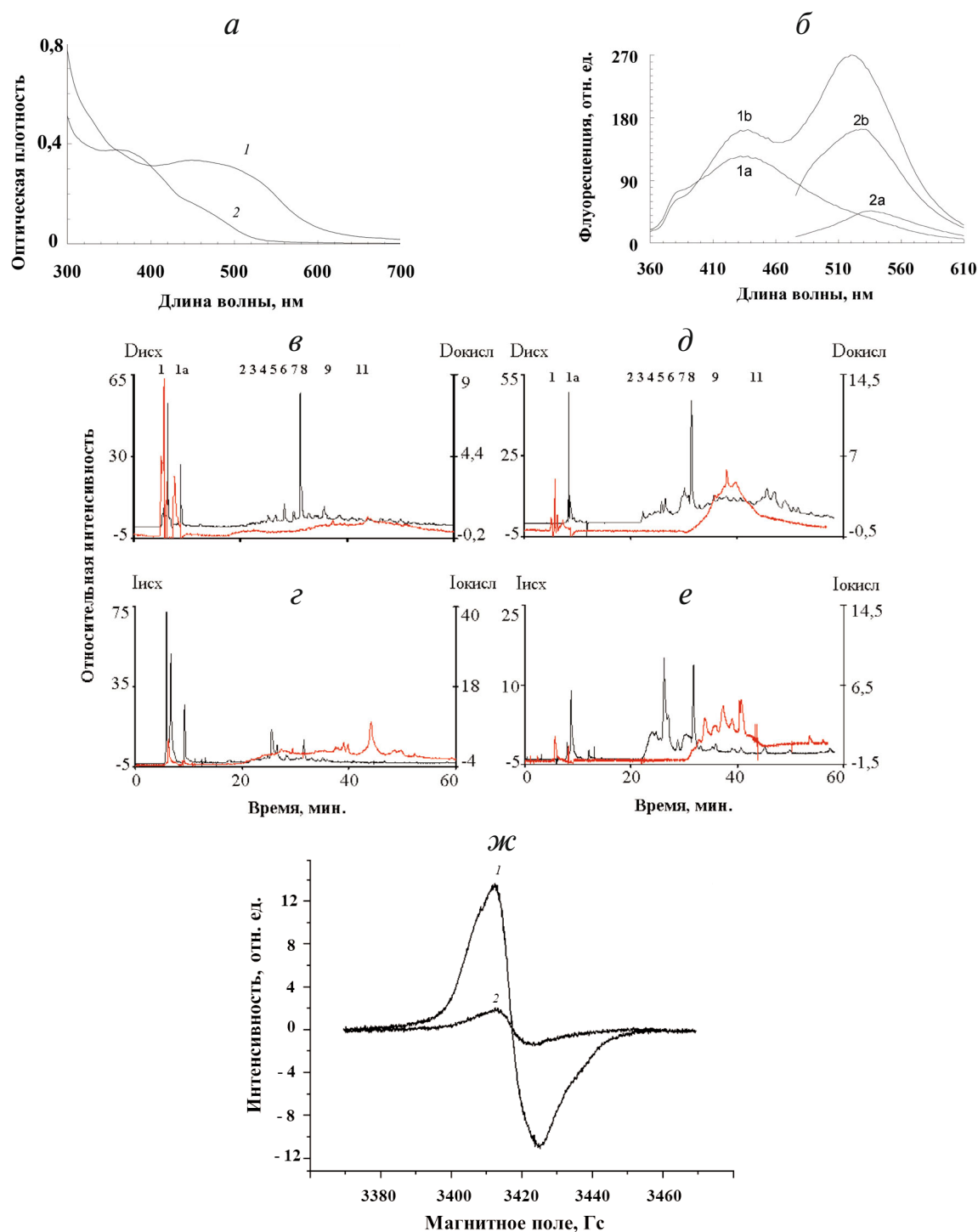


Рис. 5. Действие пероксида водорода на оммохромы насекомых. *a* – Абсорбционный спектр оммохромов жука чернотелки до (1) и после (2) окисления пероксидом водорода; *б* – спектры флуоресценции оммохромов жука чернотелки при длине волны возбуждения 340 нм (1) и 460 нм (2). Исходный спектр (а) и спектр после действия пероксида водорода (б); *в–е* – ВЭЖХ анализ оммохромов из глаз жука чернотелки до и после воздействия на них перексидом водорода (*в* – детектирование по поглощению на длине волны 380 нм; *г* – детектирование флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны 380 нм; *д* – детектирование по поглощению на длине волны 490 нм; *е* – детектирование флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны 460 нм); черная кривая – исходный образец, красная кривая – после воздействия пероксидом водорода. Для хроматограмм исходного образца (D_{исх} или I_{исх}) и после воздействия пероксидом водорода (D_{окисл} и I_{окисл}) показаны отдельные оси ординат. D – детектирование по поглощению, I – детектирование по флуоресценции; *ж* – сигнал ЭПР оммохромов бабочки бразник табачный. Исходный спектр (1); спектр после окисления пероксидом водорода (2). Измерения проведены на суспензии оммохромов в фосфатном буфере при температуре жидкого азота

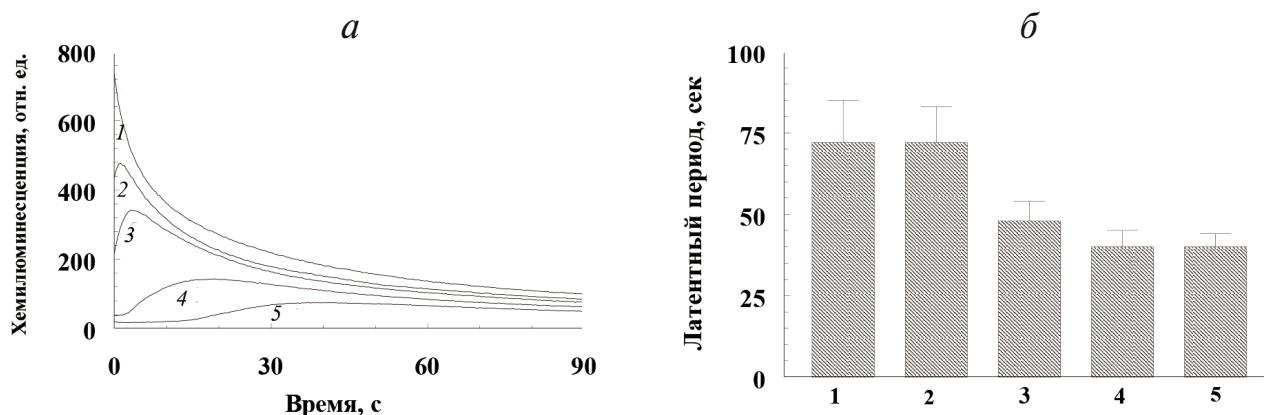


Рис. 6. Тушение хемилюминесценции люминола оммоusernameами насекомых. *а* — Кинетика хемилюминесценции люминола в присутствии различных концентраций оммоusernameов мраморного таракана. 1 — контроль, 2–5 — добавлено 100 мкг/мл, 150 мкг/мл, 250 мкг/мл и 400 мкг/мл оммоusernameов соответственно. Контрольными образцами служили пробы, содержащие буферный раствор без оммоusernameов; *б* — латентный период возгорания хемилюминесценции люминола в присутствии различных оммоusernameов в концентрации 750 мкг/мл. 1 — муха черная львинка, 2 — таракан мраморный, 3 — бабочка бражник табачный, 4 — жук чернотелка, 5 — саранча пустынная. Каждый столбик — результат 4 независимых измерений. Данные статистически значимы для $p < 0,05$. Среда инкубации содержала 0,05 М К-фосфатный буфер, pH 7,4, 2,0 мкМ гемоглобин, 100 мкМ люминол, 100 мкМ ЭДТА и суспензию различных оммоusernameов в К-фосфатном буфере. Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода

дение амплитуды хемилюминесценции, так и увеличение временного периода достижения максимума свечения.

Концентрация оммоusernameов 400 мкг/мл (рис. 6, *а*, кривая 5) вызвала значительное ингибирование развития процесса хемилюминесценции люминола. Для сравнения антирадикальной активности различных оммоusernameов, были определены сравнительные величины латентного периода хемилюминесценции люми-

нола при одинаковой концентрации всех изучаемых оммоusernameов (рис. 6, *б*), составляющей 750 мкг/мл. Каждый столбик — среднее 4 независимых измерений латентного периода развития хемилюминесценции (рис. 6, *б*). В этих условиях наибольшей антирадикальной активностью обладали оммоusernameы мухи черная львинка и мраморного таракана (столбики 1 и 2), а оммоusernameы жука чернотелки и саранчи пустынной (столбики 4 и 5) проявляли наименьшую антира-

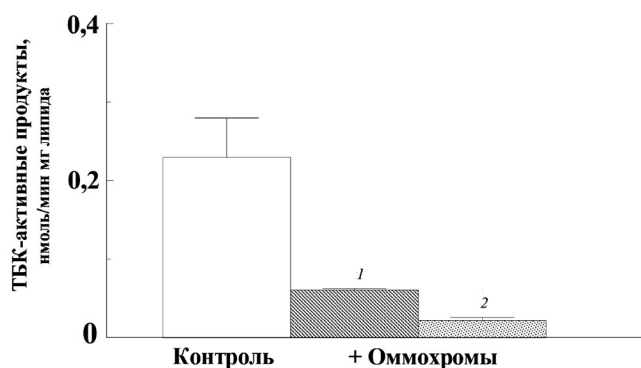


Рис. 7. Ингибирующее действие оммоusernameов мухи черная львинка (1) и бабочки бражник табачный (2) на Fe^{2+} — аскорбат индуцированную пероксидацию кардиолипидных липосом. Каждый столбик — результат трех независимых измерений. Результат статистически значим для $p < 0,05$. Среда инкубации содержала 0,1 М К-фосфатный буфер, pH 7,4, 265 мкг/мл кардиолипидных липосом, 0,5 мМ аскорбат и 35 мкМ Fe^{2+} . Концентрация оммоusernameов была 90 мкг/мл; контроль без добавления оммоusernameов

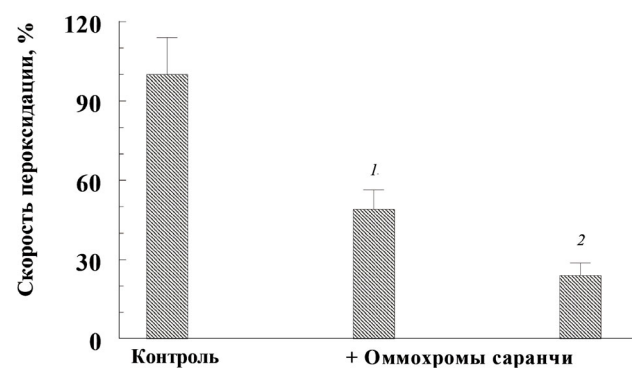


Рис. 8. Ингибирующее действие оммоusernameов пустынной саранчи на пероксидацию наружных сегментов фоторецепторных клеток (НСФ), инициированную облучением видимым светом в присутствии липофусциновых гранул. Каждый столбик — результат трех независимых измерений. Результат статистически значим для $p < 0,05$. Среда инкубации содержала 0,1 М К-фосфатный буфер, pH 7,4, 200 мкг/мл белка НСФ и 5×10^6 гранул/мл липофусцина; концентрация оммоusernameов составляла 46 (1) и 77 мкг/мл (2), соответственно; контроль — скорость пероксидации НСФ в отсутствие оммоusernameов принята за 100%

дикальную активность. Этот результат коррелирует с данными по концентрации стабильных свободно радикальных центров в оммохромах. Действительно, их концентрация в оммохромах жука чернотелки и саранчи пустынной минимальна. С другой стороны, остается непонятным более высокая антирадикальная активность оммохромов мраморного таракана (столбик 2) по сравнению с таковой для оммохромов бабочки табачного бражника (столбик 3), поскольку концентрация парамагнитных центров оммохромов бабочки значительно выше, чем у мраморного таракана. Как уже упоминалось, константа тушения хемилюминесценции люминола оммохромами мухи черная львинка довольно высока, что характеризует эти пигменты как довольно сильные антиоксиданты. Из рис. 6, б следует, что эффективность тушения хемилюминесценции оммохромами мраморного таракана не уступает таковой для оммохромов черной львинки, а эффективность тушения хемилюминесценции оммохромами бабочки бражник табачный, жука чернотелки и саранчи пустынной хотя и ниже, чем у оммохромов мухи черная львинка, но сопоставима с ней. Важно отметить, что концентрация оммохромов в глазах изученных насекомых очень высока. По нашим расчетам, содержание оммохромов, например, в глазу мухи черная львинка достигает 90 мг/мл, а в глазу саранчи пустынной 45 мг/мл. Это значительно превосходит использованные нами в эксперименте концентрации оммохромов (< 1 мг/мл).

Оммохромы всех изученных насекомых ингибировали реакции пероксидации, индуцированные различными прооксидантными системами. Антиоксидантная активность оммохромов была определена для трех различных систем индукции процесса пероксидации, для: Fe^{2+} -аскорбат-индуцированной пероксидации кардиолипидных липосом (рис. 7); аскорбат индуцированной пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток глаза быка (не показано); фотоиндуцированной пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток, сенсibilизированной липофусциновыми гранулами из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека (рис. 8).

В этих экспериментах использовали оммохромы мухи черная львинка, бабочки бражник табачный (рис. 7) и саранчи пустынной (рис. 8). Все они проявляли выраженную антиоксидантную активность, ингибируя процессы пероксидации и фотопероксидации уже в относительно низких концентрациях. Антиоксидантная активность оммохромов насекомых была сопоставима с таковой для природных меланинов [12] и для синтетических антиоксидантов оксипиридино-

вого ряда [23]. В наших экспериментах оммохромы в концентрации 0,5 мг/мл приводили к практически 90% ингибированию свободнорадикальных процессов. Важно отметить, что оммохромы эффективно тормозили сенсibilизированную липофусцином фотопероксидацию наружных сегментов фоторецепторных клеток (рис. 8). Уже в концентрации 0,08 мг/мл ($\approx 0,2$ мМ) они ингибировали эту реакцию на 70%, тогда как хорошо известный синтетический антиоксидант мексидол в концентрации 0,5 мМ ингибировал эту же реакцию не более чем на 50% [35]. Поэтому, разумно предположить, что оммохромы, содержащиеся в сложных глазах насекомых в большом избытке, могут оказывать значительное антиоксидантное действие. Механизмы антиоксидантного действия оммохромов могут быть связаны с их реакцией с активными формами кислорода и со способностью утилизировать свободные радикалы [9, 11, 15, 16].

Таким образом, разработана относительно простая процедура изоляции оммохромов из голов кормовых насекомых. По своим типичным физико-химическим характеристикам эти пигменты могут быть отнесены к группе омматинов [1, 2, 8, 36]. Кормовые насекомые, широко используемые в практических целях и культивируемые в контролируемых условиях (как в лабораторных, так и промышленных масштабах), являются хорошими природными источниками большого количества оммохромов. Так, по нашим данным, из голов мухи черная львинка можно извлечь более 4% сухого веса оммохромов от влажного веса исходного сырья. Благодаря своей биологической активности эти природные пигменты могут рассматриваться как перспективные фармакологические препараты, главным образом, для предотвращения и лечения патологий, связанных с развитием окислительного стресса. Полученные нами результаты важны для понимания механизмов осуществления биологической функции оммохромов как экранирующих и антиоксидантных пигментов, в первую очередь, в омматидиях сложного глаза беспозвоночных животных.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-04-00411).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Содержание и эксперименты с животными были выполнены в соответствии с Правилами лабораторной практики Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708н от 23-08.2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Butenandt, A., and Schafer, W. (1962) *Recent Progress in the Chemistry of Natural and Synthetic Coloring Matters and Related Fields* (Gore, T. S., Joshi, B. S., Sunthakar, S. V., and Tilak, B. D., eds.) Academic Press, NY, USA, pp. 13-34, doi: 10.1177/004051756303300710.
- Figon, F., and Casas, J. (2019) Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **94**, 156-183, doi: 10.1111/brev.12441.
- Riou, M., and Christides, J.-P. (2010) Cryptic color change in a crab spider (*Misumena vatia*): Identification and quantification of precursors and ommochrome pigments by HPLC, *J. Chem. Ecol.*, **36**, 412-423, doi: 10.1007/s10886-010-9765-7.
- Stavenga, D. G., Leertouwer, H. L., and Wilts, B. D. (2014) Coloration principles of nymphaline butterflies – thin films, melanin, ommochromes and wing scale stacking, *J. Exp. Biol.*, **217**, 2171-2180, doi: 10.1242/jeb.098673.
- Panettieri, S., Gjinaj, E., John, G., and Lohman, D. J. (2018) Different ommochrome pigment mixtures enable sexually dimorphic Batesian mimicry in disjunct populations of the common palmfly butterfly, *Elymnias hypermnestra*, *PLoS One*, **13**, e0202465, doi: 10.1371/journal.pone.0202465.
- Dontsov, A. E., Fedorovich, I. B., Lindström, M., and Ostrovsky, M. A. (1999) Comparative study of spectral and antioxidant properties of pigments from the eyes of two *Mysis relicta* (Crustacea, Mysidacea) populations, with different light damage resistance, *J. Compar. Physiol. B*, **169**, 157-164, doi: 10.1007/s003600050206.
- Грибакин Ф. Г. (1981) *Механизмы фоторецепции насекомых*, Наука, Л., с. 214.
- Островский М. А., Зак П. П., Донцов А. Е. (2018) Меланосомы глаза позвоночных и оммохромы глаза беспозвоночных как экранирующие клеточные органеллы, *Известия РАН Сер. Биол.*, **6**, 658-668, doi: 10.1134/S0002332918060103.
- Ostrovsky, M. A., Sakina, N. L., and Dontsov, A. E. (1987) An antioxidative role of ocular screening pigments, *Vis. Res.*, **27**, 893-899, doi: 10.1016/0042-6989(87)90005-8.
- Insausti, T. C., LeGall, M., and Lazzari, C. R. (2013) Oxidative stress, photodamage and the role of screening pigments in insect eyes, *J. Exp. Biol.*, **216**, 3200-3207, doi: 10.1242/jeb.082818.
- Островский М. А., Донцов А. Е. (2019) Меланосомы глаза позвоночных и оммохромы глаза беспозвоночных как антиоксидантные клеточные органеллы, *Известия РАН Сер. Биол.*, **1**, 95-108, doi: 10.1134/S0002332919010089.
- Ushakova, N., Dontsov, A., Sakina, N., Bastrakov, A., and Ostrovsky, M. (2019) Antioxidative properties of melanins and ommochromes from black soldier fly *Hermetia illucens*, *Biomolecule*, **9**, 408, doi: 10.3390/biom9090408.
- Stowe, S. (1983) Phagocytosis of rhabdomeral membrane by crab photoreceptors, *Cell Tissue Res.*, **234**, 463-467, doi: 10.1007/BF00213782.
- Фельдман Т. Б., Донцов А. Е., Яковлева М. А., Федорович И. Б., Линдстрем М., Доннер К., Островский М. А. (2008) Сравнение систем антиоксидантной защиты в глазах двух популяций креветок *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea), отличающихся по их устойчивости к фотоповреждению, *Сенсорные системы*, **22**, 309-316.
- Romero, Y., and Martinez, A. (2015) Antiradical capacity of ommochromes, *J. Mol. Model.*, **21**, 220, doi: 10.1007/s00894-015-2773-3.
- Zhuravlev, A. V., Zakharov, G. A., Shchegolev, B. F., and Savvateeva-Popova, E. V. (2016) Antioxidant properties of kynurenes: density functional theory calculations, *PLoS Comput. Biol.*, **12**, e1005213, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005213.
- Farmer, L. A., Haidasz, E. A., Griesser, M., and Pratt, D. A. (2017) Phenoxazine: a privileged scaffold for radical-trapping antioxidants, *J. Org. Chem.*, **82**, 10523-10536, doi: 10.1021/acs.joc.7b02025.
- Егоров С. Ю., Красновский А. А., Донцов А. Е., Островский М. А. (1987) Тушение синглетного молекулярного кислорода экранирующими пигментами – меланинами и оммохромами, *Биофизика*, **32**, 685-687.
- Егоров С. Ю., Бабижаев М. А., Красновский А. А., Шведова А. А. (1987) Фотосенсибилизированная генерация синглетного молекулярного кислорода эндогенными фотосенсибилизаторами хрусталика глаза человека, *Биофизика*, **32**, 169-171.
- Снытникова О. А., Шерин П. С., Копылова Л. В., Центалович Ю. П. (2007) Кинетика и механизм реакции фотовозбужденного кинуренина с молекулами биологических соединений, *Известия РАН. Сер. Хим.*, **4**, 704-710, doi: 10.1007/s11172-007-0109-x.
- Tsentlovich, Y. P., Snytnikova, O. A., Sherin, P. S., and Forbes, M. D. (2005) Photochemistry of kynurenine, a tryptophan metabolite: properties of the triplet state, *J. Phys. Chem. A*, **109**, 3565-3568, doi: 10.1021/jp045142k.
- Донцов А. Е., Ушакова Н. А., Садыкова В. С., Бастрakov А. И. (2020) Оммохромы *Hermetia illucens*: получение, исследование антиоксидантных характеристик и антимикробной активности, *Прикл. Биохим. Микробиол.*, **56**, 90-95, doi: 10.31857/S0555109920010043.
- Смирнов Л. Д., Кузнецов Ю. В., Проскуряков С. Я., Скворцов В. Г., Носко Т. Н., Донцов А. Е. (2011) Антирадикальная и NO-ингибирующая активность β-гидроксизетокси производных азотистых гетероциклов, *Биофизика*, **56**, 316-321, doi: 10.1134/S000635091102028X.
- Донцов А. Е., Сакина Н. Л., Островский М. А. (2017) Потеря меланина клетками РПЭ глаза связана с его окислительной деструкцией в составе меланолипидо-фусциновых гранул, *Биохимия*, **82**, **8**, 1188-1198, doi: 10.1134/S0006297917080065.
- Mc Dowell, J. H. (1993) Preparing rod outer segment membranes, regenerating rhodopsin, and determining rhodopsin concentration, in: *Methods in Neurosciences* (Hargrave, P. A., ed) Acad. Press, New York, **15**, pp. 123-130, doi: 10.1016/B978-0-12-185279-5.50013-3.
- Li, J., Berntsen, B. T., and James, A. A. (1999) Oxidation of 3-hydroxykynurenine to produce xanthommatin for eye pigmentation: a major branch pathway of tryptophan catabolism during pupal development in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 329-338, doi: 10.1016/S0965-1748(99)00007-7.
- Теселкин Ю. О., Бабенкова И. В., Любицкий О. Б., Клебанов Г. И., Владимиров Ю. А. (1997) Измерение антиоксидантной активности плазмы крови в системе гемоглобин – пероксид водорода – люминол, *Вопросы Мед. Химии*, **43**, 87-92.
- Ottolenghi, A. (1959) Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **7**, 355-363, https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90414-X.
- Figon, F., Munsch, T., Croix, C., Viaud-Massuard, M.-C., Lanoue, F., and Casas, J. (2019) Biological identification and localization of uncyclized xanthommatin, a key intermediate in ommochrome biosynthesis: an *in vitro*–*in vivo* study, *bioRxiv Preprint*, doi: 10.1101/666529.
- Martel, R. R., and Law, J. H. (1991) Purification and properties of an ommochrome-binding protein from the

- hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 21392-21398.
31. Bolton, J. R. (1972) Experimental aspects of biological electron spin resonance studies, in *Biological Application of Electron Spin Resonance* (Swartz, H. M., Bolton, J. R., and Borg, D. C., eds.), Wiley (Interscience), NY, USA, 1972, p. 11.
32. Lhoste, J.-M., Haug, A., and Ptak, M. (1966) Electron paramagnetic resonance studies of photoselected triplet molecules. I. Phenoxazine, *J. Chem. Phys.*, **44**, 648-654, doi: 10.1063/1.1726739.
33. Bolognese, A., Bonomo, R. P., Chillemi, R., and Sciuto, S. (1990) Oxidation of 3-hydroxykynurenine. An EPR investigation, *J. Heterocyclic Chem.*, **27**, 2207-2208, doi: 10.1002/jhet.5570270762.
34. Ephrussi, B., and Herold, J. L. (1944) Studies of eye pigments of drosophila. I. Methods of extraction and quantitative estimation of the pigment components, *Genetics*, **39**, 148-175.
35. Донцов А. Е., Коромылова А. Д., Кузнецов Ю. В., Сакина Н. Л., Островский М. А. (2014) Антирадикальная и фотопротекторная активность оксибиола – нового водорастворимого антиоксиданта гетероароматического ряда, *Известия РАН. Сер. Хим.*, **5**, 1159-1163, doi: 10.1007/s11172-014-0565-z.
36. Becker, E. (1942) On the properties, distribution and the genetic developmental physiological significance of the pigments of the ommatin and ommin group (ommochromes) in arthropods, *Mol. Gener. Genet.*, **80**, 157-204, doi: 10.1007/BF01741981.

OMMOCHROMES OF THE COMPLEX EYE OF INSECTS: PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITY*

A. E. Dontsov¹, N. L. Sakina¹, M. A. Yakovleva¹, A. I. Bastrakov², I. G. Bastrakova³,
A. A. Zagorinsky⁴, N. A. Ushakova², T. B. Feldman^{1,5}, and M. A. Ostrovsky^{1,5**}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; E-mail: ostrovsky@mail.ru

² Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

³ All-Russian Research Institute of Silviculture and Mechanization of Forestry, 141200 Pushkino, Moscow Region, Russia

⁴ Russian Forest Protection Center, 141202 Pushkino, Moscow Region, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received April 1, 2020

Revised May 5, 2020

Accepted May 8, 2020

The objective of this study was screening of ommochromes from the compound eyes of insects and comparison of their antioxidant properties. Ommochromes were isolated in preparative quantities from insects of five different families: Stratiomyidae, Sphingidae, Blaberidae, Acrididae, and Tenebrionidae. The yield of ommochromes (dry pigment weight) was 0.9-5.4% of tissue wet weight depending on the insect species. Isolated pigments were analyzed by high-performance liquid chromatography and represented a mixture of several ommochromes of the ommatin series. The isolated ommochromes displayed a pronounced fluorescence with the emission maxima at 435-450 nm and 520-535 nm; furthermore, the emission intensity increased significantly upon ommochrome oxidation with hydrogen peroxide. The ommochromes produced a stable EPR signal consisting of a singlet line with $g = 2.0045-2.0048$, width of 1.20-1.27 mT, and high concentration of paramagnetic centers ($> 10^{17}$ spin/g dry weight). All the investigated ommochromes demonstrated high antiradical activity measured from the degree of chemiluminescence quenching in a model system containing luminol, hemoglobin, and hydrogen peroxide. The ommochromes strongly inhibited peroxidation of the photoreceptor cell outer segments induced by visible light in the presence of lipofuscin granules from the human retinal pigment epithelium, as well as suppressed iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. The obtained results are important for understanding the biological functions of ommochromes in invertebrates and identifying invertebrate species that could be used as efficient sources of ommochromes for pharmacological preparations to prevent and treat pathologies associated with the oxidative stress development.

Keywords: ommochromes, insects, EPR spectrometry, fluorescence, antioxidant activity