

УДК 577.0

## ВОДОРАСТВОРИМЫЙ АНТИОКСИДАНТНЫЙ ЭКСТРАКТ ЛИЧИНОК *Ulomoides dermestoides* ПОВЫШАЕТ СПОСОБНОСТЬ К РАСПОЗНАВАНИЮ ПРЕДМЕТОВ И КООРДИНАЦИЮ ДВИЖЕНИЙ У СТАРЕЮЩИХ МЫШЕЙ

© 2022 г. Н. А. Ушакова<sup>1</sup>, \*, А. В. Амбарян<sup>1</sup>, А. И. Бастраков<sup>1</sup>, А. И. Бутенко<sup>2</sup>, А. Е. Донцов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>ООО «НАТУРБИОН», Москва, 109559 Россия

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля  
Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2022 г.

После доработки 25.07.2022 г.

Принята к публикации 11.08.2022 г.

Получены водные экстракты из личинок и взрослых жуков *Ulomoides dermestoides*, которые охарактеризованы по антиоксидантным свойствам и каталазной активности. Оценивали тушение хемилюминесценции люминола, результаты сравнивали с действием синтетического аналога витамина Е (тролокса), измеряя в одинаковых условиях зависимость амплитуды хемилюминесценции от концентрации антиоксиданта. Каталазную активность измеряли по содержанию пероксида водорода в реакции с молибдатом аммония. Каталазная активность экстракта личинок и экстракта жуков составила соответственно  $6.3 \pm 1.1$  и  $20.0 \pm 1.8$  мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка. По антиоксидантной активности 1 мг/мл белка экстракта личинок эквивалентен  $1.36 \pm 0.3$  мМ тролокса. Антиоксидантная активность 1 мг/мл белка экстракта жука эквивалентна  $0.97 \pm 0.2$  мМ тролокса. У стареющих мышей C57BL/6 (возраст при тестировании – 19 месяцев при средней продолжительности жизни 24 месяца), получавших с кормом 3 месяца два раза в неделю по 400 мкг/кг экстракта личинок *U. dermestoides*, иммобилизованного на пищевом сорбенте, в виде биологически активной добавки достоверно повышались когнитивные способности по распознаванию нового предмета относительно референтного, мышечный тонус и координация движений на вращающемся барабане и при спуске с вертикального шеста.

**Ключевые слова:** *Ulomoides dermestoides*, личинка, жук, экстракт, антиоксидантная активность, мыши, старение, когнитивные способности, координация движений

DOI: 10.56304/S0234275822050143

Проблема активного долголетия привлекает внимание многих исследователей. Известна роль антиоксидантов для защиты головного мозга при дисбалансе прооксидантной и антиоксидантной систем. Это становится причиной оксидативного стресса, который, по мнению ряда авторов, является важным фактором старения [1]. Антиоксиданты, благодаря их способности противодействовать свободным радикалам и нейтрализовать окислители, используют для лечения или облегчения симптомов заболеваний, связанных с активными формами кислорода [2, 3], к которым относятся различные нейродегенеративные патологии [4]. Способность организма производить антиоксиданты

снижается с возрастом, поэтому прием антиоксидантов имеет важное значение для сохранения активного долголетия. Актуальна разработка препаратов-антиоксидантов, тормозящих возрастные нарушения организма. Особый интерес представляют антиоксиданты природного происхождения. В качестве источника биологически активных соединений рассматривают насекомых, которые к тому же относятся к перспективным объектам для получения новых субстанций для фармацевтического применения [5]. В практике народной медицины Китая, Японии и стран Латинской Америки известен жук-чернотелка *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae), которого используют против широкого спектра болезней. В научных исследованиях показан антидиабетический эффект

Список сокращений: АОА – антиоксидантная активность.

[6] и противовоспалительное действие водного экстракта этого насекомого на модели острого плеврита крыс [7]. В опытах *in vitro* выявлен эффект, аналогичный действию нестероидного противовоспалительного препарата нимесулида [8]. Ранее нами показано, что экстракт жука родственного вида чернотелки – *Alphitobius diaperinus* – способен блокировать действие пронеуротоксина МРТР (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) в экспериментальной модели болезни Паркинсона [9].

В работе исследовали антиоксидантные свойства экстрактов личинок и жука *Ulomoides dermestoides* и возможность использования экстракта личинок для улучшения когнитивных способностей и двигательных навыков стареющих животных за счет дополнительного получения мышами натурального комплекса антиоксидантов насекомого [10].

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Работа одобрена Комиссией по этике ИПЭЭ РАН № 56 от 22.03.2022 г.

### *Получение экстрактов*

В работе анализировали водные экстракты личинок и взрослых жуков *Ulomoides dermestoides*, выращенных в искусственных контролируемых условиях на сухих кормовых субстратах (смеси геркулеса и кукурузной муки). После отделения жуков или личинок от кормового субстрата просеиванием через сито с ячейкой диаметром 1.0–1.5 мм биомассу промывали, гомогенизировали растиранием в холодной дистиллированной воде в холодной ступке холодным пестиком (1 : 15 вес/объем) и экстрагировали на холоду двое суток при медленном перемешивании. Экстракты фильтровали через капроновую марлю для отделения твердых частиц и мембранный фильтр Millipore (Merck, Германия) с диаметром пор 0.1 мкм для антибактериальной обработки. Хранили экстракты при  $-18^{\circ}\text{C}$ . Водные экстракты из личинок жука сравнивали по показателям каталазной и антиоксидантной активностей (АОА).

### *Оценка каталазной активности*

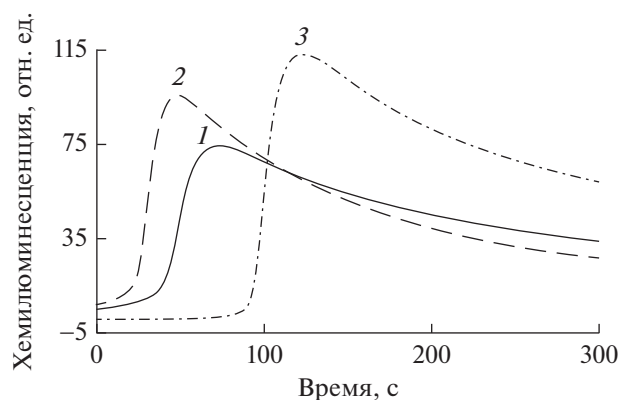
Предварительно в экстрактах определяли содержание белка микробулетным методом с использованием двулучевого спектрофотометра Shimadzu RF 5301PC (Shimadzu, Япония) [11]. Каталазную активность определяли спектрофотометрически при 410 нм – по изменению концентрации пероксида водорода в комплексе с молибдатом [12].

### *Оценка антиоксидантной активности*

АОА оценивали по тушению хемилюминесценции люминола. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF 5301PC при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре. Для количественной оценки способности экстракта личинки жука взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе этой модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах зависимости латентного периода от концентрации белка в экстракте, а также по уменьшению амплитуды хемилюминесценции в присутствии экстракта. В последнем случае измеряли интенсивность хемилюминесценции в контроле, где экстракт был заменен буферным раствором ( $I_0$ ), и в опытных образцах с различным содержанием экстракта ( $I$ ) с последующим пересчетом в координатах зависимости величины  $[(I_0/I) - 1]$  от концентрации белка в экстракте. Полученную зависимость сравнивали с таковыми для амплитуды и латентного периода хемилюминесценции в присутствии тролокса (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) – водорастворимого синтетического аналога природного антиоксиданта витамина Е. Среда для инкубации содержала 0.05 М калий-фосфатный буфер, рН 7.4, 2.0 мкМ гемоглобин, 100 мкМ люминол, 100 мкМ ЭДТА и различные объемы экстрактов личинки (от 10 мкл до 150 мкл). Реакцию начинали добавлением 100 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В качестве контроля использовали буферный раствор вместо экстракта. Результаты сравнивали с действием тролокса, измеряя в тех же условиях зависимость амплитуды хемилюминесценции от концентрации тролокса.

### *Анализ когнитивных способностей мышей*

Исследование когнитивных способностей и двигательных навыков проводили на стареющих мышах линии C57BL/6 (возраст животных при тестировании – 19 месяцев), по 8 особей в опытной и контрольной группах. Животные получали в течение 3 мес 2 раза в неделю с кормом по 400 мкг/кг экстракта, иммобилизованного на пищевом сорбенте, в виде биологически активной добавки (БАД). Мышам проводили три поведенческих теста: на когнитивные способности по распознаванию новых предметов, координацию движений на вертикальном шесте и мышечный тонус на вращающемся барабане (ротароде). Использовали методику распознавания объектов, основанную на естественной тенденции грызунов тратить больше времени на изучение незнакомого стимула, чем знакомого [13]. Тест на координацию двигательной активности на вертикальном шесте использовали в соответствии с описанной ранее методикой [14].



**Рис. 1.** Характерная кинетика возгорания и тушения хемилюминесценции люминола в присутствии экстрактов личинки (1) и жука (2) *Ulomoides dermestoides* и тролокса (3).

**Fig. 1.** Characteristic kinetics of ignition and extinguishing of luminol chemiluminescence in the presence of extracts of larva (1) and beetle (2) *Ulomoides dermestoides*, and trolox (3).

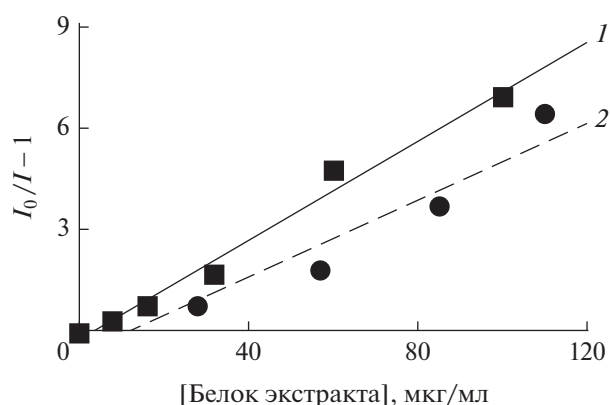
При попарных сравнениях групп использовали процедуру Мараскуило. Уровень значимости при попарных сравнениях групп —  $\alpha = 0.05$ . Статистический анализ проводили в программе XLSTAT 2019 2.2. В тесте на двигательной контроль на ротароде мышей сажали на вращающийся барабан при скорости 6 об/мин; скорость вращения увеличивалась автоматически на 1 об/мин каждую минуту до достижения скорости 20 об/мин; тест продолжался 1080 с [15]. В этом тесте регистрировали время, которое каждая мышь держится, не падая, и предельную скорость вращения барабана. Если мышь могла продержаться на ротароде 1080 с и удержаться при скорости 20 об/мин, то тест считался выполненным на 100%. Статистический анализ проводили с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. При оценке результатов тестов принимали, что мыши прожили 80% от средней продолжительности жизни, которая по литературным данным составляет 24 месяца [16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Каталазная активность экстракта личинок и экстракта жуков составила соответственно:  $6.3 \pm 1.1$  и  $20.0 \pm 1.8$  мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка (рис. 1).

По АОА 1 мг/мл белка экстракта личинок был эквивалентен  $1.36 \pm 0.3$  мМ тролоксу, а 1 мг/мл белка экстракта жука —  $0.97 \pm 0.2$  мМ тролоксу (рис. 2).

Полученные нами значения АОА оказались ниже, чем ранее сообщали D. Mendoza и др. [10] для метанольного экстракта жука *Ulomoides dermestoides*:  $3.65 \pm 0.5$  эквивалента тролокса. Возможно это связано с различиями в методике экстракции: водная и метанольная, — а также не исключено,

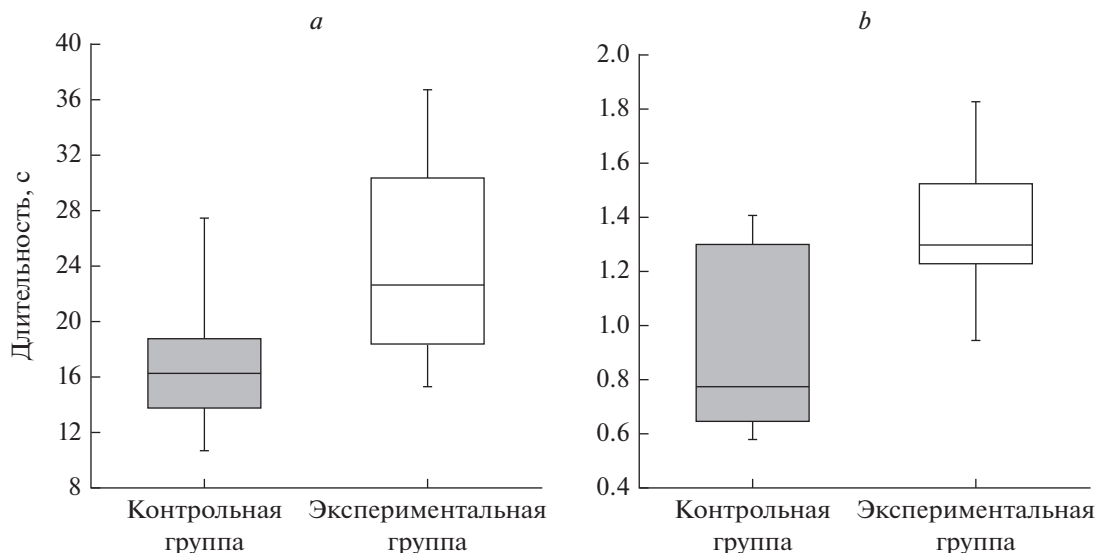


**Рис. 2.** Антиоксидантная активность экстрактов личинки (1) и жука (2) *Ulomoides dermestoides*.

**Fig. 2.** Antioxidant activity of extracts of larva (1) and beetle (2) *Ulomoides dermestoides*.

что при использовании мембранной фильтрации в целях антибактериальной обработки экстрактов были адсорбированы и некоторые активные компоненты. В составе ранее идентифицированных нами антиоксидантных белков жука *Ulomoides dermestoides* присутствовали супероксиддисмутаза, каталаза, вителлогенинподобный белок, а также небелковые соединения: различные фенольные антиоксиданты, в том числе производные гидрохинона. Важную роль в биологической активности экстракта жука в условиях оксидативного стресса могут играть и белки теплового шока, также содержащиеся в этом экстракте [17]. Учитывая наличие АОА в водном экстракте личинки *Ulomoides dermestoides*, мы предположили присутствие у них белков антиоксидантной системы — по аналогии с экстрактом жука. Кроме того, в экстракте личинок зарегистрирована и каталазная активность, хотя она ниже, чем в экстракте жука. И все-таки мы использовали в качестве определяющего показателя функционирования антиоксидантной системы *Ulomoides dermestoides* величину АОА, отражающую суммарную активность всех компонентов. В связи с тем, что АОА была выше в водном экстракте личинок *Ulomoides dermestoides*, а не жуков, для выявления эффекта природных антиоксидантов этого насекомого на поведение экспериментальных животных тестировали действие именно экстракта личинок, который вводили в рацион стареющих мышей C57BL/6 в виде БАД. Состояние животных сравнивали в трех поведенческих тестах.

В тесте на распознавание нового предмета регистрировали и сравнивали длительность обследования нового и старого предметов при каждом к ним приближении. Выяснили, что общая длительность обследования нового предмета за 5 мин тестирования в экспериментальной группе животных была достоверно больше, чем в контроль-



**Рис. 3.** Результаты теста на запоминание старых и распознавание новых предметов. Медиана и проценти (10–90%) средней длительности обследования нового предмета при каждом подходе к нему (а) и общей длительности обследования нового предмета за 5 мин тестирования (б).

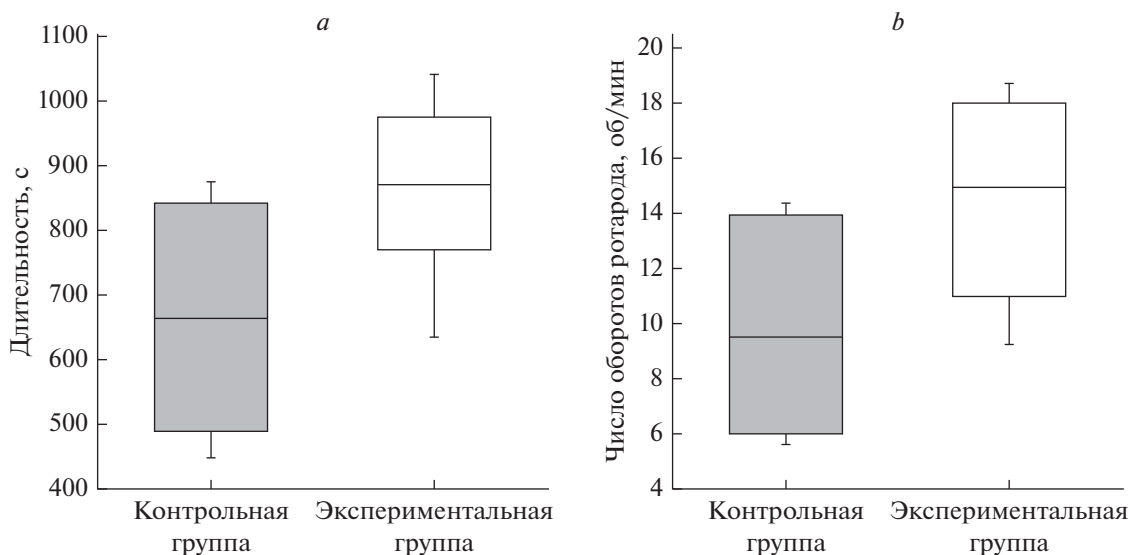
**Fig. 3.** The results of the test for memorizing old and recognizing new items. Median and percentiles (10–90%) of the average duration of examination of a new subject at each approach to it (a) and the total duration of examination of a new subject for 5 min of testing (b).

ной (тест Манна–Уитни:  $U = 11$ ,  $P = 0.049$ ). Результат представлен на рис. 3.

В тесте на координацию движений на вертикальном шесте (в трех последовательных тестах) показано, что длительность максимального времени нахождения на шесте у экспериментальной группы животных была достоверно больше, чем у

контрольной, и составила  $66.062 \pm 8.247$  с против  $24.224 \pm 4.450$  с ( $p < 0.05$ ).

При оценке двигательных навыков в тесте на вращающемся барабане (ротароде) время, проведенное на барабане животными экспериментальной группы (от максимально возможного по методике эксперимента), было достоверно больше, чем



**Рис. 4.** Результаты тестирования мышей C57BL/6 на ротароде. Медиана и стандартное отклонение длительности нахождения на барабане ротарода (а) и числа пройденных оборотов барабана ротарода (б).

**Fig. 4.** Results of testing of C57BL/6 mice on rotarode. The median and standard deviation of the duration of being on the rotarode drum (a) and the number of revolutions of the rotarode drum (b) passed.

в контрольной группе. Кроме того, число оборотов ротарода в минуту, которое выдержали мыши экспериментальной группы до падения, было также достоверно выше ( $p < 0.05$ ) показателей контрольной группы (рис. 4).

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы. Способность мышей экспериментальной группы дольше удерживаться на вертикальном шесте по сравнению с контрольной группой – следствие повышенного мышечного тонуса и более скоординированной двигательной системы. Дело в том, что шест “неудобен” для выполнения поставленной задачи – удерживаться на нем длительное время. По-видимому, лучший моторный контроль и координация движений позволяет мышам экспериментальной группы более длительное время удерживаться на шесте, чем животным контрольной группы. Кроме того, более высокий мышечный тонус позволяет мышам из экспериментальной группы дольше удерживаться на барабане ротарода и выдерживать более высокие скорости его вращения.

В работе показано, что водный экстракт личинок *Ulomoides dermestoides* обладает антиоксидантной активностью и при использовании в рационе мышей C57BL/6 в виде биологически активной добавки повышает когнитивные способности стареющих животных, улучшает моторный контроль и координацию движений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kregel K., Zhang H. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, unclonal effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2007, 292(1), R18–R36. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00327.2006>
2. Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S., Lyamzaev K.G., Mansikh V.N., Moshkin M.P., Novikov E.A., Popovich I.G., Rogovin K.A., Shabalina I.G., Shekarova O.N., Skulachev M.V., Titova T.V., Vygodin V.A., Vysokikh M.Yu., Yurova M.N., Zabezinsky M.A. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(11), 1110–1119. <https://doi.org/10.18632/aging.100404>
3. Firuzi O., Miri R., Tavakkoli M., Saso L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18, 3871–3888. <https://doi.org/10.2174/092986711803414368>
4. Miller T.M., Pestronk A., David W., Rothstein J., Simpson E., Appel S.H., Andres P.L., Mahoney K., Allred P., Alexander K., Ostrow L.W., Schoenfeld D., Macklin E.A., Norris D.A., Manousakis G., Crisp M., Smith R., Bennett C.F., Bishop K.M., Cudkovicz M.E. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol.*, 2013, 12, 435–442. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(13\)70061-9](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(13)70061-9)
5. Shriram H. Bairagi. Insects with potential medicinal significance: a review. *Biomed. J. Sci. & Tech. Res.*, 2019, 16(3), 12024–12027. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.16.002849>
6. Jasso-Villagomez E.I., Garcia-Lorenzana M., Almanza-Perez J.C., Fortis-Barrera M.A., Blancas-Flores G., Roman-Ramos R., Prado-Barragan L.A., Alarcon-Aguilar F.J., Beetle (*Ulomoides dermestoides*) fat improves diabetes: effect on liver and pancreatic architecture and on PPAR $\gamma$  expression. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2018, 51(6), e7238. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187238>
7. Santos R.C., Lunardelli A., Caberlon E., Bastos C.M., Nunes F.B., Pires M.G., Biolchi V., Paul E.L., Vieira F.B., Resende do Carmo Aquino A., Corseuil E., de Oliveira J.R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. *Inflammation*, 2010, 33(3), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s10753-009-9171-x>
8. Mendoza D.L., Saavedra S. Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Vitae*, 2013, 20(1), 41–48.
9. Ushakova N.A., Koval'zon V.M., Shevchenko V.P., Nagayev I. Yu., Rybalkina E. Yu., Revishchin A.V., Ambaryan A.V., Bastrakov A.I., Pavlova G.V., Pavlov D.S. Blockage of the action of the proneurotoxin MPTP and toxin MPP $^{+}$  by extracts of homogenates of *Alphitobius diaperinus* litter beetles in an experimental model of Parkinson's disease. *Neurochem. J.*, 2018, 12(1), 78–87. <https://doi.org/10.1134/S1819712418010166>
10. Mendoza D., Salgado M., Durant L. Capacidad antioxidante de extractos metanólicos de cuerpo entero del escarabajo *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1893). *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, 2013, 32, 402–410.
11. Itzhaki R.F., Gill D.M. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.*, 1964, 9, 401–416. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(64\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(64)90200-3)
12. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta*, 1991, 196, 143–151. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-m](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-m)
13. Ennaceur A., Delacour J.A. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I. Behavioral data. *Behav. Brain Res.*, 1988, 31(1), 47–59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x)
14. Fernagut P.O., Chalou S., Digué E., Guilloteau D., Tison F., Jaber M. Motor behaviour deficits and their histopathological and functional correlates in the nigrostriatal system of dopamine transporter knockout mice. *Neuroscience*, 2003, 116, 1123–1130. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00778-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00778-9)
15. Kovalzon V.M., Ambaryan A.V., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Rybalkina E.Y., Bastrakov A.I., Ushakova N.A. Biological activity of the *Tenebrionidae* beetle antioxidant complex in a murine neurotoxic model of Parkinson's disease. *Syst. Rev. Pharm.*, 2021, 12(10), 569–577. <https://doi.org/10.51268/srp.2021.10.7>
16. Sinatra D.S., Sinatra S.T., Heyser C.J. The effects of coenzyme Q10 on locomotor and behavioral activity in young and aged C57BL/6 mice. *BioFactors*, 2003, 18(1–4), 283–287. <https://doi.org/10.1002/biof.5520180232>
17. Ushakova N.A., Brodsky E.S., Tikhonova O.V., Dontsov A.E., Marsova M.V., Shelepchikov A.A., Bastrakov A.I. Novel extract from beetle *Ulomoides dermestoides*: a study of composition and antioxidant activity. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(7), 1055. <https://doi.org/10.3390/antiox10071055>

## Water-Soluble Antioxidant Extract of *Ulomoides dermestoides* Larvae Enhances Object Recognition and Coordination of Movements in Aging Mice

N. A. Ushakova<sup>a, #</sup>, A. V. Ambaryan<sup>a</sup>, A. I. Bastrakov<sup>a</sup>, A. I. Butenko<sup>b</sup>, and A. E. Dontsov<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Severtsov Institute of Ecology and Evolution,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup>*NATURBION LLC, Moscow, 109559 Russia*

<sup>c</sup>*Emanuel Institute of Biochemical Physics,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: naushakova@gmail.com*

**Abstract**—Aqueous extracts from *Ulomoides dermestoides* larvae and adult beetles have been obtained and characterized in terms of antioxidant properties and catalase activity. The suppression of luminol chemiluminescence was evaluated; the results were compared with the action of a synthetic analogue of vitamin E (Trolox), by measuring the dependence of chemiluminescence amplitude on antioxidant concentration under the same conditions. Catalase activity was determined by the content of hydrogen peroxide in reaction with ammonium molybdate. The catalase activity of the larval extract and beetle extract was  $6.3 \pm 1.1$  and  $20.0 \pm 1.8 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  protein, respectively. In terms of antioxidant activity, 1 mg/mL of larval extract protein was equivalent to  $1.36 \pm 0.3$  mM Trolox; the corresponding value for the beetle extract protein was  $0.97 \pm 0.2$  mM Trolox. Aging mice C57BL/6 (age at testing 19 months with an average lifespan of 24 months) received 400  $\mu\text{g/kg}$  of *U. dermestoides* larvae extract immobilized on a food sorbent in the form of biologically active additives. As a result, a significant increase was observed in cognitive abilities to recognize a new object relative to the reference one, as well as in muscle tone and coordination of movements on a rotating drum and when descending from a vertical.

**Keywords:** *Ulomoides dermestoides*, larva, beetle, extract, antioxidant activity, mice, aging, cognitive abilities, motion coordination