

УДК 591.5 (595.792) : 615.3.092

© Н. З. Ключева, Д. Б. Рыжов, С. Г. Карпова и С. Я. Резник

# ВЛИЯНИЕ ТРАНКВИЛИЗАТОРА ФЕНИБУТА НА РЕГУЛЯЦИЮ СУТОЧНОГО РИТМА TRICHOGRAMMA EMBRYOPHAGUM HTG. (HYMENOPTERA, TRICHOGRAMMATIDAE)

[N. Z. KLYUEVA, D. B. RYZHOV, S. G. KARPOVA a. S. Ya. REZNIK. INFLUENCE OF PHENYBUT ON REGULATION OF DAILY RHYTHM OF ADULT ECLOSION IN TRICHOGRAMMA EMBRYOPHAGUM HTG. (HYMENOPTERA, TRICHOGRAMMATIDAE)]

Общеизвестна та значительная роль, которую играют полезные насекомые в жизни человека. Говоря о видах, специально разводимых в лабораториях и на биофабриках для той или иной надобности, чаще всего подразумевают энтомофагов — хищников и паразитоидов (Монастырский, Горбатовский, 1991). Между тем морфологическое, физиологическое и экологическое разнообразие насекомых в сочетании с небольшими денежными затратами и относительной легкостью культивирования делает их уникальными модельными объектами для самых разнообразных исследований. Для генетиков незаменимым объектом исследований стала дрозофила *Drosophila melanogaster* Mg., для физиологов — таракан *Periplaneta americana* L. Результаты экспериментов со многими другими видами насекомых, например мясной мухой *Calliphora vicina* R.-D. (Виноградова, 1984), были использованы для обобщений, относящихся не только к членистоногим, но и другим представителям животного мира.

Тот факт, что в нервной системе насекомых медиаторную и нейротрансмисмиттерную функцию осуществляют те же вещества (моноамины, гамма-аминомасляная кислота, ацетилхолин, глицин и другие), что и у позвоночных животных, включая человека (Hill et al., 1981; Kerkut, 1985; Pitman, 1985; Neal, 1997; Bettler et al., 1998; Aydar, Beadle, 1999), позволяет использовать модельные виды насекомых также и для изучения свойств ряда фармакологических препаратов, влияющих на процессы синаптической передачи.

В нашем исследовании использовался фенибут, фенильное производное гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) — тормозного медиатора в нервной системе как позвоночных, так и беспозвоночных животных. ГАМК взаимодействует с 3 типами рецепторов: ГАМК<sub>а</sub>, ГАМК<sub>б</sub> и ГАМК<sub>с</sub>. В клинической практике ГАМК и ее производные широко используются для лечения нарушений сна, как миорелаксанты центрального действия, а также для лечения наркотической зависимости от психостимуляторов (Регистр лекарственных средств России, 2002).

Фенибут является агонистом ГАМК<sub>б</sub>-рецепторов, локализирующихся в пресинаптических окончаниях возбуждающих и тормозных нейронов. При действии фенибута на возбуждающие нейроны стимуляция ГАМК<sub>б</sub>-рецепторов приводит к торможению выброса нейротрансмиттеров в синаптиче-

скую щель и тем самым блокирует проведение возбуждающего сигнала. В тормозных нейронах под действием фенибута снижается выброс ГАМК в синаптическую щель и тем самым ослабляется ее тормозное действие. Таким образом, фенибут оказывает на тормозные процессы в нервной системе двоякое действие: с одной стороны, он блокирует выделение возбуждающих медиаторов, ослабляя силу реакций, а с другой — частично блокирует также и тормозное действие ГАМК, что ведет к усилению тех же реакций. Преобладание одного из двух противоположных эффектов (и знак конечного результата) может определяться как спецификой реакции, так и дозой препарата (MacDemott et al., 1999).

В качестве модельного объекта для данного исследования нами был выбран паразитоид-яйцеед *Trichogramma embryophagum* Htg. Представители этого рода, успешно использующиеся для биологической борьбы с вредителями, широко известны также и в качестве модельных объектов для различных лабораторных исследований. В естественных условиях имаго трихограммы питаются углеводным кормом (различными жидкостями растительного происхождения), могут также выпивать капельки жидкости, выступающей после прокола хориона яйца хозяина и также содержащей большое количество углеводов (Sander et al., 1984). Многочисленные экспериментальные исследования разных авторов (Ashley, Gonzalez, 1974; Hohmann et al., 1988; Leatemia et al., 1995; Hegazi, Khafagi, 1998) убедительно показали, что выживаемость и плодовитость самок трихограммы в лабораторных условиях резко возрастают при питании различными углеводными кормами, как естественными (мед, нектар, сок растений), так и искусственными (растворы сахарозы, глюкозы, фруктозы и т. п.). При этом белковые добавки (пыльца растений, маточное молочко пчел, гидролизаты мяса и дрожжей) не вызывали увеличения продолжительности жизни трихограммы и числа отложенных ею яиц по сравнению с особями контроля, питавшихся раствором меда (Hegazi, Khafagi, 1998) или даже чистой водой (Ashley, Gonzalez, 1974). Однако так как у насекомых (в отличие от позвоночных) практически отсутствуют пептидазы, пептиды могут в неизмененном виде всасываться через стенку пищеварительного тракта (Turunen, 1985). Это допускает возможность использования энтерального пути введения препарата, т. е. добавления субстанции к углеводной подкормке.

Исследуемым процессом был суточный ритм вылета имаго паразитоида из хориона яйца хозяина. У подавляющего большинства видов трихограммы при фотопериоде пик вылета наблюдается незадолго до или вскоре после включения света (Резник и др., 1998; Заславский и др., 1999). На сегодняшний день накоплен значительный объем данных о механизмах контроля ритма вылета имаго трихограммы (подробнее об этом см. в обсуждении).

Целью данного исследования были апробация методики энтерального применения фенибута и выявление его влияния на суточный ритм вылета имаго *T. embryophagum*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для предварительного исследования зависимости смертности трихограммы от концентрации фенибута в углеводной подкормке свежевывлетевших имаго случайным образом распределяли по пробиркам, на стенки которых наносили несколько капель раствора фенибута в 50%-ном растворе сахара (контрольные особи получали 50%-ный раствор сахара). Опыты проходили в константных условиях при фотопериоде С : Т = 18 : 6 и 20°. Смертность имаго определяли через 48 ч после начала опыта. Каждая концентрация фенибута была исследована в 2 повторностях, включавших не менее 100 особей каждая. Так как определенная смертность (около 20 %) имаго была отмечена также и в контроле, данные были преобразованы по формуле  $Y = (X - C) / (1 - C)$ , где  $X$  — доля имаго, погибших в течение 49 ч при питании раствором фе-

нибута, а С — смертность в контроле. На рис. 1 представлены эти преобразованные данные (проценты и доверительные интервалы).

Для выявления влияния фенибута на суточную динамику отрождения имаго самки трихограммы в течение первых суток после отрождения получали в качестве углеводной подкормки 1%-ный раствор фенибута в 50%-ном растворе сахара (контрольные особи получали 50%-ный раствор сахара). Ритмика вылета имаго исследовалась у потомства подопытных и контрольных особей, развитие которого проходило в стандартных условиях С : Т = 12 : 12, 20°. В первом варианте опыта эти условия оставались неизменными на протяжении всего эксперимента, а во втором варианте в день учета свет был включен преждевременно, после двухчасового периода темноты. Эксперимент был проведен в 16 повторностях. Вылетевших имаго учитывали каждые 2 ч, на рис. 2 изображены доли особей, вылетевших к концу каждого двухчасового периода. Для определения достоверности различий динамики вылета использовали критерий Фишера с f-преобразованием (Ивантер, Коросов, 1992).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Из рис. 1 видно, что смертность имаго зависит от концентрации фенибута в углеводной подкормке. При данной методике опыта LD<sub>50</sub> составила около 2 %.

Что же касается суточной ритмики вылета имаго, то из рис. 2, а видно, что в первом варианте эксперимента (и развитие личинок, вылет имаго при С : Т = 12 : 12) пик вылета был отмечен через 2 ч после включения света, различия между опытом и контролем практически отсутствовали. В варианте с преждевременным включением света (рис. 2, б) отмечены некоторые различия между опытом и контролем. У потомства самок, получавших подкормку с фенибутом, наблюдался более интенсивный преждевременный вылет: доля особей, вылетевших в течение первых 2 ч массового отрождения (с 8 до 10 ч по шкале времени опыта), была достоверно ( $F = 11.2, p < 0.01$ ) выше, а интенсивность пика вылета (с 10 до 12 ч) соответственно достоверно ( $F = 14.2, p < 0.01$ ) ниже, чем у потомства контрольных особей. Таким образом, фенибут модифицировал суточную динамику вылета имаго дочернего поколения трихограммы, не изменяя при этом положения пика и общей конфигурации ритма.

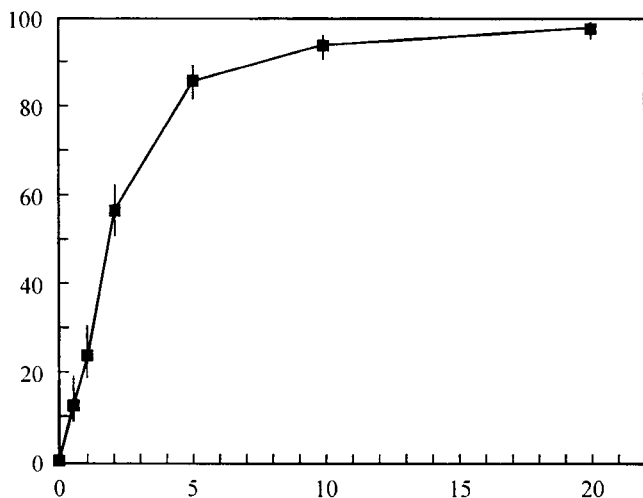


Рис. 1. Влияние концентрации фенибута в углеводной подкормке на смертность имаго *Trichoграмма embryophagum*.

По оси абсцисс — концентрация фенибута (%), по оси ординат — доля особей, погибших в течение 48 ч с начала опыта (% и доверительный интервал 0.95).

Кривая, приведенная на рис. 1, свидетельствует о наличии дозозависимого эффекта при энтеральном введении фенибута. Следовательно, всасывание фенибута (а возможно, и других аминокислот и моноаминов) происходит в зависимости от его концентрации в корме, что позволяет провести количественную оценку вызываемого им эффекта.

Результаты нашего исследования (рис. 2) свидетельствуют о достоверном влиянии фенибута на суточный ритм вылета потомства подопытных самок. Тот факт, что эффект проявлялся только в варианте с преждевременным включением света, можно объяснить следующими особенностями контроля суточных ритмов у насекомых и, в частности, у трихограммы.

Известно, что суточная динамика активности насекомых контролируется «биологическими часами» — эндогенными ритмическими процессами в

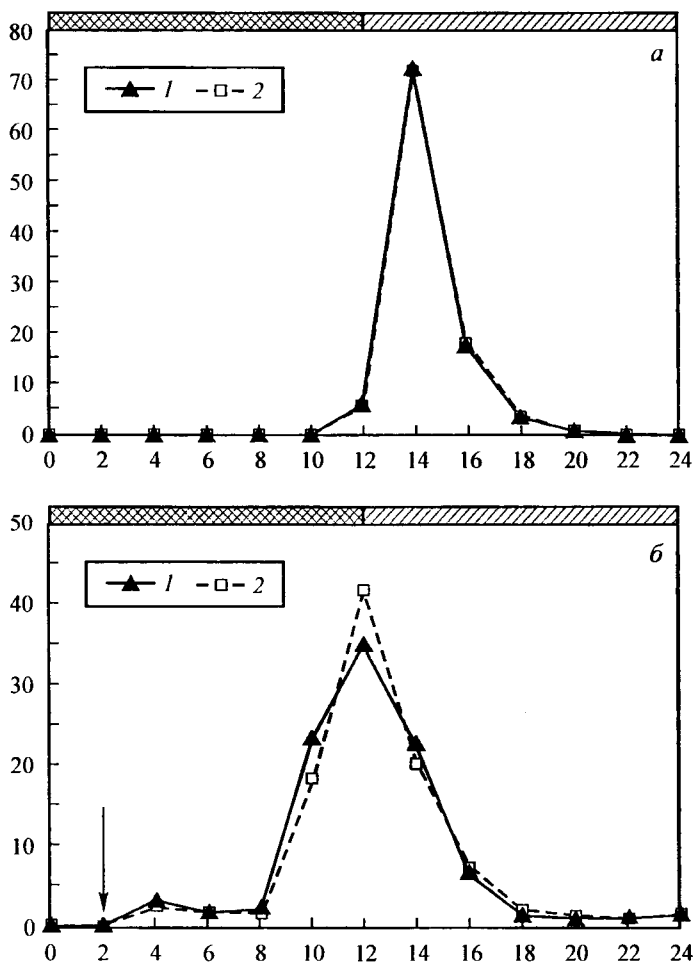


Рис. 2. Динамика вылета имаго *Trichogramma embryophagum* из хориона яйца хозяина.

По оси абсцисс — время опыта (часы), по оси ординат — доля имаго, вылетевших за соответствующий двухчасовой промежуток времени. Варианты опыта: а — фотопериод С : Т = 12 : 12 неизменен на протяжении всего опыта (положение ското- и фотофазы обозначено соответственно *темными* и *светлыми* прямоугольниками над графиком), б — преждевременное включение света в день учета (обозначено *стрелкой* над осью абсцисс). Режим питания материнского поколения: 1 — 1%-ный раствор фенибута в 50%-ном растворе сахара, 2 — контроль (50%-ный раствор сахара).

организме. Кроме того, изменения освещенности или температуры могут непосредственно подавлять или усиливать их активность, вызывая так называемые «экзогенные эффекты» (Saunders, 1982). Например, включение света может стимулировать вылет трихограмм из яиц хозяина практически в любое время суток (Заславский и др., 1999).

Ранее (Карпова, Reznik, 2002) было показано, что готовность к вылету у *T. embryophagum* изменяется в течение 24-часового цикла под контролем эндогенного циркадианного ритма. Она минимальна в начале «ночи» и достигает максимума к концу темного периода (т. е. к 12 ч при фотопериоде С : Т = 12 : 12). В это время включение света вызывает реакцию «спускового крючка» (Чернышев, 1984), которая выражается в массовом отрождении трихограмм из яиц хозяина. Очевидно, высокая степень эндогенной мотивации к вылету могла нивелировать тонкие различия в способности отреагировать на световой стимул между контрольными и подопытными особями в варианте с 12-часовой скотофазой (рис. 2, а).

Для того чтобы изучить реакцию на данный фактор при более низкой чувствительности особей к стимулу, в данном исследовании были проведены эксперименты с преждевременным включением света (рис. 2, б). После короткого периода темноты воздействие света вызывает очень слабую реакцию, с 8-часовой задержкой, что и дало возможность выявить достоверные различия между контрольными и подопытными насекомыми. Более интенсивный вылет в интервале от 8 до 10 ч у потомства самок, получивших фенибут с пищей, свидетельствует, на наш взгляд, об увеличении фоточувствительности особей под влиянием данного нейротрансммитера.

Хорошо известно, что влияние света на механизмы, контролирующие суточные ритмы беспозвоночных и позвоночных животных, в значительной степени регулируется серотонин-эргической системой (Takahashi et al., 1989; Morin, Blanchard, 1991; Proseer et al., 1993). У насекомых инъекция серотонина приводит к снижению фоточувствительности нейронов зрительной системы (Tomioka et al., 1993; Kloppeburg, Erber, 1995; Tomioka, 1999). Воздействие метерголина (неспецифичного антагониста серотонина) на оптические доли сверчков вызывало противоположный эффект — увеличение реактивности нейронов (Saifullah, Tomioka, 2002). На этих же объектах было показано, что блокировка синтеза серотонина путем введения нейротоксина сопровождается усилением поведенческой реакции особей на включение света (Germ, Tomioka, 1998).

Возможно, повышение чувствительности трихограмм к фотостимулу под влиянием фенибута также может объясняться ингибированием серотонин-эргической передачи, поскольку известно, что стимуляция ГАМК<sub>В</sub>-рецепторов оказывает тормозное влияние на моноаминэргическую передачу в нейрональных сетях, в том числе выделяющих серотонин в качестве постсинаптического медиатора (Neal, 1997).

Особый интерес представляет, на наш взгляд, также и сама возможность использования насекомых для исследования тонких механизмов действия ряда психотропных препаратов, являющихся агонистами и антагонистами дофаминовых, серотониновых, адreno- и ГАМК-рецепторов, при энтеральном применении.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградова Е. Б. Мясная муха (*Calliphora vicina*) — модельный объект экологических и физиологических исследований. Л.: Наука, 1984. 272 с.
- Заславский В. А., Зиновьева К. Б., Умарова Т. Я., Резник С. Я. Взаимодействие циркадианного ритма, синхронизированного фото- и термопериодом и прямого действия света и температуры в определении динамики отрождения имаго двух видов трихограммы // Энтомол. обзор. 1999. Т. 78, вып. 1. С. 3—14.

- Ивантер Э. В., Коросов А. В. Основы биометрии. Петрозаводск: Изд-во ПГУ. 1992. 164 с.
- Монастырский А. Л., Горбатовский В. В. Массовое разведение насекомых для биологической защиты растений. М.: Агропромиздат, 1991. 240 с.
- Резник С. Я., Зиновьева К. Б., Умарова Т. Я. и Заславский В. А. Зависимость ритма вылета имаго от фото- и термопериода у видов рода *Trichogramma* Westw. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) // Энтомол. обозр. 1998. Т. 77, вып. 1. С. 17—25.
- Регистр лекарственных средств России. М.: Изд-во РЛФ, 2002. Вып. 9. 885 с.
- Ashley T. R., Gonzalez D. Effect of various food substances on longevity and fecundity of *Trichogramma* // Environ. Ent. 1974. Vol. 3, N 1. P. 169—171.
- Aydar E., Beadle D. J. The pharmacological profile of GABA receptors on cultured insect neurons // J. Insect Physiol. 1999. Vol. 45, N 3. P. 213—219.
- Bettler B., Kaupmann K., Bowery N. GABA<sub>B</sub> receptors: drugs meet clones // Current Opinion in Neurobiology. 1998. Vol. 8. P. 345—350.
- Germ M., Tomioka K. Effects of 5,7-DHT injection into the optic lobe on the circadian locomotor rhythm in the cricket, *Gryllus bimaculatus* // Zool. Science. 1998. Vol. 15. P. 317—322.
- Hegazi E. M., Khafagi W. E. Studies on three species of trichogramma. III. Comparison of longevity and fecundity of adult wasps fed on selected foods // Alexandria J. Agric. Res. 1998. Vol. 43, N 2. P. 79—88.
- Hill D. R., Bowery N. G. <sup>3</sup>H-Baclofen and <sup>3</sup>H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA<sub>B</sub> sites in rat brain // Nature. 1981. Vol. 290, N 5806. P. 149—152.
- Hohmann C. L., Luck R. F., Oatman E. R., Platner G. R. Effects of different biological factors on longevity and fecundity of *Trichogramma platneri* Nagarcatti (Hymenoptera: Trichogrammatidae) // Ann. Soc. Ent. Brasil. 1989. Vol. 18 (suppl.). P. 61—70.
- Karpova S. G., Reznik S. Ya. Interaction of exogenous factors (light and temperature) in their influence on the daily pattern of adult eclosion in *Trichogramma embryophagum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) // Eur. J. Ent. 2002. Vol. 99, N 4. P. 427—436.
- Kerkut G. A. Insect pharmacology comes of age // Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, 1985. Vol. 11. P. 1—3.
- Kloppenburger P., Erber J. The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of honeybee (*Apis mellifera* L.) II. Electrophysiological analysis of motion-sensitive neurons in the lobula // J. Comp. Physiol. A. 1995. Vol. 176. P. 119—129.
- Leatemia J. A., Laing J. E., Corrigan J. E. Effects of adult nutrition on longevity, fecundity, and offspring sex ratio of *Trichogramma minutum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) // Canad. Ent. 1995. Vol. 127, N 2. P. 245—254.
- Lund H. O. Studies on longevity and productivity of *Trichogramma evanescens* // Journal of Agricultural Research 1938. Vol. 56. P. 421—439.
- MacDemott A. B., Role L. W., Siegelbaum S. A. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release // Ann. Rev. Neurosci. 1999. Vol. 22. P. 443—485.
- Morin L. P., Blanchard J. Depletion of brain serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light // Brain Res. 1991. Vol. 566. P. 173—185.
- Neal M. J. Medical pharmacology at a glance. Blackwell Science, London, 1997. 104 p.
- Pitman R. M. Nervous system // Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, 1985. Vol. 11. P. 5—54.
- Proseer R. A., Dean R. R., Edgar D. M., Heller H. C., Miller J. D. Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists // J. Biol. Rhythms. 1992. Vol. 8. P. 1—16.
- Saifullah A. S. M., Tomioka K. Serotonin sets the day state in the neurons that control coupling between optic lobe circadian pacemakers in the cricket *Gryllus bimaculatus* // J. Exp. Biol. 2002. Vol. 205. P. 1305—1314.
- Sander K., Gutzzeit H. O., Jackle H. Insect embryogenesis: morphology, physiology, genetic and molecular aspects // Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, 1985. Vol. 1. P. 319—385.
- Saunders D. S. Insect clocks. Oxford: Pergamon Press, 1982. 409 p.
- Takahashi J. S., Nelson D. E., Eskin A. Immunocytochemical localization of serotonergic fibers innervating the ocular circadian system of *Aplysia* // Neuroscience. 1989. Vol. 28. P. 139—147.
- Tomioka K. Light and serotonin phase-shift the circadian clock in the cricket optic lobe in vitro // J. Comp. Physiol. A. 1999. Vol. 185. P. 437—444.
- Tomioka K., Ikeda M., Nagano T., Tamotsu S. Involvement of serotonin in the circadian rhythm of an insect visual system // Naturwissenschaften. 1993. Vol. 80. P. 37—139.
- Turunen S. Absorption // Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, 1985. Vol. 4. P. 241—277.

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; Поступила 2 IX 2003.  
 Медицинская академия постдипломного образования,  
 Санкт-Петербург;  
 Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург.