

УДК 57.044/638.1/576.08

ДЕЙСТВИЕ ИМИДАКЛОПРИДА НА КЛЕТОЧНУЮ ИММУННУЮ СИСТЕМУ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ (*APIS MELLIFERA* L.)

© Л.Р. Гайфуллина

Неоникотиноиды, нейротоксичные инсектициды, относят к ряду факторов, увеличивающих восприимчивость пчелиных семей к болезням и вызывающих их распад. Доказано, что индукция иммунитета насекомых имеет нейрогенную природу. Исследовано влияние наиболее токсичного для пчел неоникотиноида имидаклоприда на клеточную иммунную систему рабочих особей *Apis mellifera* L. Показано, что нейротоксическое действие имидаклоприда вызывает деструктивные процессы в клетках и тканях систем индивидуального иммунитета медоносной пчелы: патологические изменения кишечника и клеток жирового тела, торможение функции жалящего аппарата, реакцию организма насекомого на собственные разрушающиеся клетки и ткани, агрегацию, адгезию и лизис гранулоцитов, выводящих значительную долю защитных клеток из кровотока; генерацию реактивных кислородных метаболитов на фоне угнетения фенолоксидазной активности в защитных клетках гемолимфы.

Ключевые слова: *Apis mellifera* L., имидаклоприд, клеточный иммунитет, фенолоксидазная система, антиоксидантная система.

В последние 20 лет неоникотиноиды – группа нейротоксичных инсектицидов – интенсивно используются в борьбе с экономически значимыми насекомыми-вредителями, достигая на мировом рынке объема в 1 млрд долларов в год [1]. Широкое применение неоникотиноидов объясняется их избирательным механизмом действия в низких дозах на насекомых, экономичностью, отсутствием кросс-резистентности к карбамату, фосфорорганическим или синтетическим пиретроидным инсектицидам, низкой токсичностью для млекопитающих, биodeградируемостью, системным продолжительным действием [2]. В то же время действие неоникотиноидов относят к ряду факторов, вызывающих массовые потери пчелиных семей в разных странах мира [3–4]. Неоникотиноиды неблагоприятно воздействуют на воспроизводство и развитие личинок [5], нарушают координацию, обонятельную память и навигационные способности пчел [1]. Крупномасштабные исследования свидетельствуют, что распад пчелиных семей является результатом действия нескольких факторов, в том числе не-

оникотиноидов, увеличивающих восприимчивость пчелиных семей к болезням [3].

Неоникотиноиды действуют избирательно на центральную нервную систему насекомых в качестве агонистов постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, вызывая возбуждение нервов и в конечном итоге паралич, приводящий к смерти. Наиболее токсичным для пчел неоникотиноидом является имидаклоприд, который в 7 000 раз токсичнее ДДТ. Изучение механизмов взаимодействия нервной и иммунной систем является одним из главных направлений современной иммунологии человека и высших животных. О существовании такого рода взаимодействий у насекомых и других беспозвоночных до сих пор известно крайне мало. Так, показана нейрогенная природа индукции гуморального иммунного ответа у насекомых [6]. Доказано, что сублетальное воздействие имидаклоприда усиливает образование спор кишечного паразита медоносной пчелы *Nosema* [7]. Комплекс данных фактов сформировал вопрос о влиянии неоникотиноида имидаклоприда на клеточную иммунную си-

стему медоносной пчелы, решение которого является целью данной работы.

Материалы и методы. Объектом исследования служили рабочие особи *A. mellifera*. В качестве нейротоксиканта использовали готовую препаративную форму имидаклоприда в виде препарата Танрек в концентрации 0,00004%, вызывающей 20% гибель пчел (ЛК25). Обработку насекомых производили перорально, путем разведения препарата в медовом сиропе. Спустя 24 ч 3 суток оценивали состояние кишечника, жирового тела, морфо-функциональной структуры гемоцитов и определяли активность ферментов фенолоксидазной (ФО) и антиоксидантной (АО) систем в гемолимфе и кишечнике пчел. Для гематологического анализа препараты гемолимфы фиксировали этиловым спиртом и окрашивали азур-эозином. Фенолоксидазную (ФО) активность в гемоцитах выявляли, инкубируя фиксированные ацетоном препараты гемолимфы в растворе 4 мг/мл L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА) в фосфатном буфере (ФБ). Пероксидазную (ПО) активность регистрировали после инкубации фиксированных в формалин-глутаровом фиксаторе препаратов гемолимфы в растворе 0,5 мг/мл диаминобензидина тетрагидрохлорида в ФБ с 0,03% перекисью водорода. Для восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) препараты гемолимфы инкубировали в ФБ с 1,7 мг/мл НСТ и 50 мкг/мл зимозана и фиксировали формалин-глутаровым фиксатором. Препараты жирового тела фиксировали 1%-м спиртовым раствором КОН и окрашивали метиленовым синим. Активность ФО (о-дифенол: O₂ оксидоредуктаза НФ 1.10.3.1) оценивали по скорости окисления L-ДОФА [8]. Активность ПО (донор: перекись водорода-оксидоредуктаза НФ 1.11.1.7) оценивали по скорости окисления бензидина [9]. Активность каталазы (перекись водорода: перекись водорода-оксидоредуктаза ЕС 1.11.1.6) определяли по скорости разложения перекиси водорода, реакцию останавливали добавлением 4%-го раствора молибдата аммония [10]. Оптическую плотность ферментов измеряли на спектро-

фотометре Shimadzu. Активность ферментов оценивали в пересчете на 1 мг белка, концентрацию которого определяли по Бредфорду, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [11]. Достоверность различий между показателями оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Действие имидаклоприда вызвало у пчел типичные симптомы, такие как нескоординированные движения, тремор и нокдаун-эффект. Через несколько часов эти симптомы постепенно исчезали, и рабочие пчелы становились гиперили гипоактивными. Спустя 24 ч наблюдались патологические изменения кишечника: увеличение длины и ширины задней кишки, гиперемия, снижение эластичности стенок, высокая чувствительность к механическим повреждениям, а также торможение функции жалающего аппарата. Токсическое действие имидаклоприда было также сопряжено с необратимыми патологическими изменениями клеток жирового тела, адипоцитов: деформацией, вакуолизацией, разрушением мембран и лизисом.

В гемолимфе пчел были обнаружены родоначальные клетки прогемоциты, фагоцитирующие клеки – плазматоциты и гранулоциты амебоидной и веретенновидной формы, клетки, синтезирующие факторы гуморального иммунитета – сферулоциты и эноцитойды. В норме у вышедших из зимовки рабочих пчел в циркуляции преобладали фагоцитирующие клетки – гранулоциты и плазматоциты – в совокупности 78,8% (рис. 1).

Действие имидаклоприда уже спустя 24 ч вызвало смещение гемограммы в сторону доли плазматоцитов, сферулоцитов и эноцитойдов на фоне уменьшения процента гранулоцитов и комплекса патологических изменений клеток гемолимфы. Среди последних были наиболее выражены агрегация, разрушение мембран и лизис гранулоцитов, что, по всей видимости, и послужило причиной уменьшения доли данных фагоцитов в циркуляции. Кроме того, отмечалась деформация и вакуолизация плазматоцитов и сферулоци-

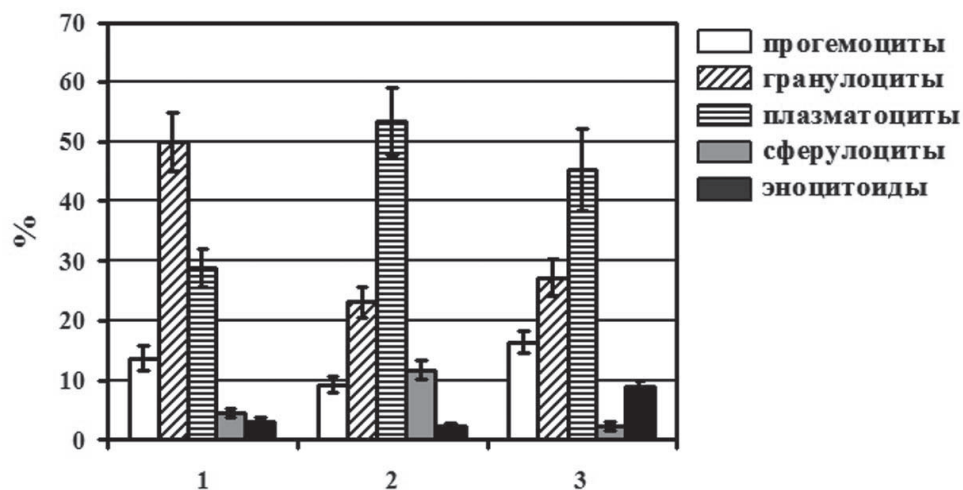


Рис. 1. Клеточная реакция гемолимфы медоносной пчелы при действии имидаклоприда: 1 – контроль, 2 – 1-е сутки после обработки имидаклопридом, 3 – 3-и сутки после обработки имидаклопридом

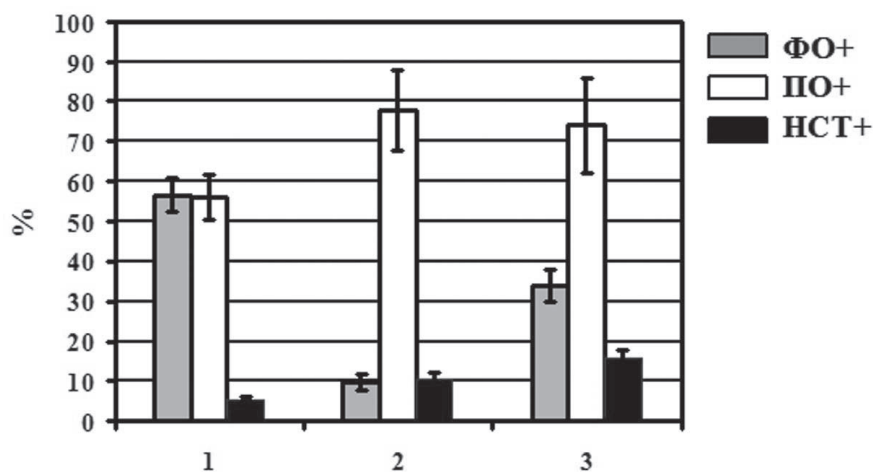


Рис. 2. Изменение доли гемоцитов медоносной пчелы, обнаруживающих активность фенолоксидазы (ФО+), пероксидазы (ПО+) и НСТ-положительную реакцию (НСТ+) при действии имидаклоприда: 1 – контроль, 2 – 1-е сутки после обработки имидаклопридом, 3 – 3-и сутки после обработки имидаклопридом

тов. Увеличение доли активно метаболизирующих клеток – сферулоцитов и эноцитойдов – свидетельствует о запуске гуморальных защитных реакций и процессов детоксикации.

В норме ФО активность обнаруживалась во всех типах гемоцитов пчел (рис. 2). Интоксикация имидаклопридом вызвала многократное снижение доли ФО-положительных гемоцитов, по-видимому, обусловленное вышеупомянутым сокращением количества гранулоцитов, претерпевающих лизис и агрегацию. Аналогичная картина наблюдалась при заражении личинок *Galleria mellonella* патогеном *Bacillus thuringiensis* и связывалась с оп-

ределенными дисфункциями кишечника, сопровождаемыми выделением в гемолимфу факторов, ингибирующих фенолоксидазу и выводящих из кровотока определенные типы гемоцитов [12].

ПО активность в норме регистрировалась в половине гемоцитов, находящихся в циркуляции, главным образом, в плазматоцитах и гранулоцитах (рис. 2). Действие инсектицида вызвало увеличение доли ПО-положительных гемоцитов и расширило их спектр до эноцитойдов, что косвенно указывает на возросший уровень образования реактивных форм кислорода (РФК) в гемолимфе пчел при

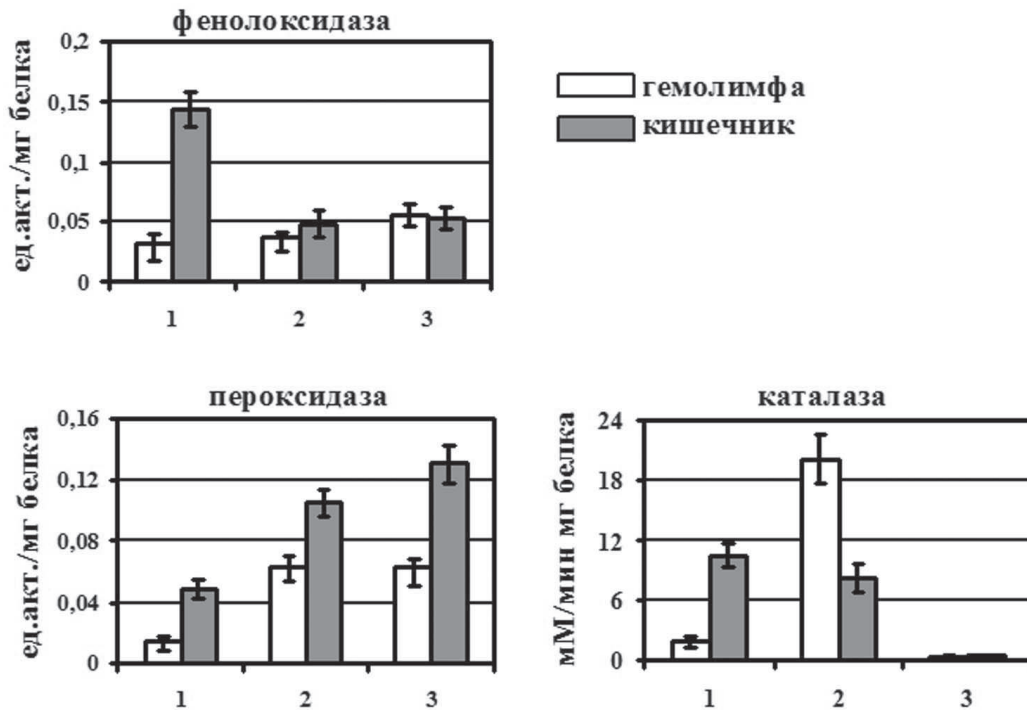


Рис. 3. Активность ферментов ФО и АО систем в гемолимфе и кишечнике медоносной пчелы при действии имидаклоприда: 1 – контроль, 2 – 1-е сутки после обработки имидаклопридом, 3 – 3-и сутки после обработки имидаклопридом

интоксикации. Непосредственным свидетельством увеличения РФК при действии имидаклоприда явилось увеличение доли гемоцитов с НСТ-положительной реакцией.

Результаты цитохимического анализа подтверждаются данными спектрофотометрического метода определения активности ферментов (рис. 3). Действие имидаклоприда вызвало угнетение ФО активности, активировав ферменты АО системы.

В целом наблюдаемые патологические процессы в кишечнике и гемолимфе медоносной пчелы при действии имидаклоприда аналогичны тем, что протекают при развитии кишечной инфекции в организме насекомых. Скорее всего, такая схожесть обусловлена начинающимися в кишечнике деструктивными процессами и реакцией организма пчелы на собственные разрушающиеся клетки и ткани. Выступая в качестве агониста постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, имидаклоприд вызывает перевозбуждение нервных клеток и последующую постсинаптическую блокаду в нервной системе.

Возникающие в нервной системе патологические нарушения приводят к расстройству регуляции физиологических и метаболических процессов. Наблюдаемые дисфункции кишечника могут сопровождаться выработкой или активацией ингибиторов протеаз, которые, ингибируя протеолиз проФО, инактивируют весь ФО каскад. Не исключено, что деструктивные процессы кишечника сопровождаются выделением в гемолимфу факторов, вызывающих агрегацию гемоцитов и их адгезию к внутренним органам, выводящих таким образом защитные клетки из кровотока. Увеличение активности антиоксидантных ферментов в гемоцитах и гемолимфе в целом, очевидно, является защитной реакцией на генерацию РФК, сопровождающую вышеперечисленные процессы.

Таким образом, нейротоксическое действие имидаклоприда в ЛК20 влечет за собой нарушение функционирования систем индивидуального иммунитета медоносной пчелы, значительно снижая жизнеспособность насекомых в условиях патогенной нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aliouane Y., Adessalam K., El Hassani A.K., Gary V., Armengaud C., Lambin M., Gauthier M. Subchronic exposure of honey bees to sublethal doses of pesticides: effect on behavior // *Environ. Toxicol. Chem.* 2009. Vol. 28. P. 113–122.
2. Jeschkel P., Nauen R. Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry // *Pest Manag. Sci.* 2008. Vol. 64. P. 1084–1098.
3. van Engelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y. et al. Colony collapse disorder: a descriptive study // *PLoS One.* 2009. Vol. 4, № 8. P. 1–17.
4. Blacquière T., Smaghe G., van Gestel C.A.M., Mommaerts V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment // *Ecotoxicol.* 2012. Vol. 21. P. 973–992.
5. Gregorc A., Ellis J.D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides // *Pest Biochem. Physiol.* 2011. Vol. 99. P. 200–207.
6. Черныш С.И., Гордя Н. А., Яковлев А.Ю. Гормональная регуляция стресса и резистентности к повреждениям у насекомых: Сборник стратегии адаптаций наземных членистоногих к неблагоприятным условиям среды // *Труды Биологического НИИ.* 2007. Вып. 53. С. 336–382.
7. Alaux C., Brunet J.L., Dussaubat C., Mondet F, Tchamitchan S., Cousin M, Brillard J., Baldy A., Belzunces L.P. and Le Conte Y. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*) // *Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 12, № 3. P. 774–782.
8. Раушенбах И.Ю. Стресс-реакция насекомых: механизм, генетический контроль, роль в адаптации // *Генетика.* 1997. Т. 33, № 8. С. 1110–1118.
9. Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // *Биохимия.* 1951. Т. 16, вып. 4. С. 352–357.
10. Королюк М.А., Токарева И.И., Майорова В.Е. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* 1988. № 1. С. 16–19.
11. Скоупс Р. Методы очистки белков. М., 1985. 342 с.
12. Глупов В.В., Хвощевская М.Ф., Щепеткин И.А., Крюкова Н.А. Морфофункциональная структура популяции гемоцитов *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при инфекционном процессе // *Известия АН. Серия Биологическая.* 1997. № 6. С. 645–653.

IMIDACLOPRID EFFECT ON THE CELLULAR IMMUNE SYSTEM OF HONEYBEE (*APIS MELLIFERA* L.)

© L.R. Gaifullina

The neurotoxic insecticides (neonicotinoids) belong to a number of factors that increase the susceptibility of bee colonies to diseases and cause their collapse. It is proved that the induction of insect immunity is of neurogenic nature. This work investigates the influence of imidacloprid, the most toxic neonicotinoid to honeybee, on the cellular immune system of *Apis mellifera* L., workers. The neurotoxic effect of imidacloprid has been demonstrated to cause destructive processes in cells and tissues of the individual systems of honeybee immunity: the pathological changes in the intestine and fat body cells, inhibition of stinging apparatus function, reaction of insect organism to own cells and tissues, aggregation, adhesion, and lysis of granulocytes deducing a significant proportion of protective cells from the bloodstream, generation of reactive oxygen metabolites against oppression of the phenoloxidase activity in protective cells of the hemolymph.

Key words: *Apis mellifera* L., imidacloprid, cell immunity, phenoloxidase system, antioxidant system.