

УДК 632.7:632.95.024.2

АКТИВНОСТЬ И НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗ У МОДЕЛЬНЫХ НАСЕКОМЫХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СУБСТРАТА ФЕРМЕНТА[§]

© 2024 г. А. Г. Кинарейкина¹, Е. А. Силиванова^{1,*}¹Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал ТюмНЦ СО РАН

625041 Тюмень, ул. Институтская, 2, Россия

*E-mail: sylvanovaea@mail.ru

Комнатная муха *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) часто служит модельным организмом для тестирования инсектицидов и изучения механизмов инсектицидной устойчивости насекомых. Оценка активности ферментов детоксикации, в том числе карбоксилэстераз (CarE), является одним из этапов в таких исследованиях. В данной работе проведено сравнение кинетических параметров ($V_{\max}$ и K_m) CarE имаго 2-х лабораторных линий *M. domestica* (TY, UF) в зависимости от использованного субстрата фермента. У особой линии TY независимо от пола насекомых скорости гидролиза 2-х субстратов (α - и β -нафтилацетата) не отличались. У самцов линии UF удельная и максимальная скорость гидролиза β -NA была соответственно в 1.90 и в 1.57 раза меньше, чем α -NA; у самок данной линии таких отличий не обнаружено. Отмечены половые отличия в характеристиках CarE при использовании в качестве субстрата *p*-нитрофенилацетата: удельная активность фермента у самцов линии UF была меньше, чем у самок (в 1.62 раза). При использовании α -NA не обнаружено статистически значимых отличий исследованных параметров фермента в зависимости от пола и линии насекомых. Данный субстрат, вероятно, был предпочтительным для измерения ферментативной активности карбоксилэстеразы у модельных насекомых *M. domestica* разных линий.

Ключевые слова: насекомые, *M. domestica* L., детоксикация инсектицидов, кинетические параметры, карбоксилэстеразы, константа Михаэлиса, максимальная скорость реакции.

DOI: 10.31857/S0002188124030063, EDN: DNSGXS

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость насекомых к инсектицидам остается широко распространенным явлением [1], снижая эффективность применения препаратов и порождая проблемы общественного здравоохранения и загрязнения окружающей среды [2, 3]. Важный аспект контроля численности устойчивых популяций насекомых заключается в изучении биохимических и молекулярных основ инсектицидной резистентности. В качестве модельного организма при тестировании инсектицидов и изучении механизмов формирования инсектицидной устойчивости часто используют синантропных насекомых, в частности лабораторные линии комнатной мухи *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) [4]. К настоящему времени у природных популяций комнатной мухи описана устойчивость к инсектицидам

широко используемых классов химических соединений (органофосфатам, карбаматам, пиретроидам, неоникотиноидам) [5].

Многие инсектициды содержат карбоксильные, фосфатные или карбаматноэфирные связи. Гидролитическое расщепление сложноэфирных связей ферментами насекомых является одним из основных механизмов детоксикации инсектицидов [6]. Ферменты, гидролизующие данные связи, относятся к эстеразам (EST, EC3.1) и представляют собой разнообразную группу с широкой и перекрывающейся субстратной специфичностью [6, 7]. Ярким представителем группы является семейство карбоксилэстераз, которые играют значительную роль в формировании и развитии инсектицидной резистентности [8]. Карбоксилэстеразы (CarE, EC3.1.1.1) – суперсемейство сериновых гидролаз, катализирующих гидролиз сложных эфиров карбоновых кислот на соответствующие спирты и карбоновые кислоты [9–11]. CarE участвуют в метаболической детоксикации эндогенных

[§]Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках проекта № 122122800052-9.

соединений (метаболизм липидов, деградация нейромедиаторов, метаболизм специфических гормонов, феромонов [10] и экзогенных токсичных веществ [12]). Было показано, что CarE играют ключевую роль в защите насекомых от ксенобиотиков, в том числе и пестицидов, таких как пиретроиды [12, 13], карбаматы, фосфорорганические соединения [6, 9–12], рианоиды [2]. Повышенная активность CarE часто связана с устойчивостью насекомых к пестицидам, что было подтверждено у комаров (*Culex tarsalis*, *Culex pipiens quinquefasciatus*, *Aphis gossypii*), мух (*Lucilia cuprina*, *M. domestica*), хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*), маленького коричневого плантоппера (*Laodelphax striatellus*), габробракона притупленного (*Habrobracon hebetor*), малого мучного хрущака (*Tribolium confusum*) [10, 11]. Вместе с тем, описано снижение активности фермента, либо разнонаправленные ее изменения у некоторых видов насекомых (в том числе у *M. domestica*), устойчивых к отдельным инсектицидам или подверженных их действию [14–16].

Измерение общей эстеразной активности и активности разных изоформ эстераз осуществляется по скорости гидролиза специфических субстратов. Широко используемыми субстратами являются нафтил ацетаты (α -NA, β -NA), нитрофенил ацетат (ρ -NPA) (рис. 1) [6, 17], 1-нафтил бутират (α -NB) [18], 4-нитрофенил бутират (ρ -NPB) и др. [19]. Из литературных данных следует, что субстратная специфичность карбоксилэстераз насекомых может различаться. Например, у белополосового шелкопряда (*Dendrolimus superans*) при исследовании цельного (неочищенного) гомогената и очищенной CarE наблюдали большее сродство фермента к β -NA, чем к α -NA [10]. И, напротив, очищенная рекомбинантная CarE хлопкового червеца (*Helicoverpa armigera*) проявляла более высокую эстеразную активность в отношении α -NA по сравнению с β -NA [11]. У самцов 2-х близкородственных видов муравьев (*Solenopsis invicta*, *S. richteri*) отмечена аналогичная ситуация (более высокая скорость гидролиза α -NA) [20]. Известно также, что карбоксилэстеразы насекомых, даже у близкородственных видов, могут иметь различные характеристики и свойства, не связанные с резистентностью к ксенобиотикам [6, 10]. Например, при использовании в качестве субстрата α -NA более высокая специфическая активность CarE была отмечена у табачного жука (*Lasioderma serricorne*), чем у аптечного жука (*Stegobium paniceum*) [9]. В другом исследовании наблюдали варьирование кинетических параметров (K_m и V_{max}) карбоксилэстеразы при использовании в качестве субстрата β -NA между представителями 6-ти рас тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) [19].

Поскольку выявляемая карбоксилэстеразная активность может зависеть от выбранного для ее

определения субстрата или расы/линии насекомых, не всегда ясно, использование какого субстрата даст надежные результаты при оценке характеристик CarE конкретного вида насекомых под воздействием инсектицидов. В отношении модельных организмов полезно иметь наиболее полную характеристику ферментов, которые могут быть вовлечены в обеспечение устойчивости к инсектицидам. Цель работы – сравнение активности и кинетических параметров (K_m , V_{max}) карбоксилэстераз самцов и самок *Musca domestica* L. 2-х лабораторных линий.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для данного исследования были использованы имаго (самки, самцы) 2-х лабораторных линий *Musca domestica* L. – ТУ и UF. Первая линия (ТУ) получена из Новосибирского аграрного университета в 2009 г., вторая (UF) – из Института биохимии и генетики УФИЦ РАН в 2023 г. Обе линии содержались без контакта с инсектицидами в инсектарии Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра Тюменского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук.

Были использованы следующие химические реактивы: EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота, $\geq 99.0\%$), PTU (N-фенилтио-мочевина, $\geq 98.0\%$), PMSF (фенилметилсульфонил фторид, $> 98.5\%$), DTE (1,4-дителиозэритритол, $\geq 99.0\%$), Triton X-100 (2-[4-(2,4,4-триметилпентан-2-ил) феноксипропан-2-ил]этанол, $\geq 100.0\%$), 1-нафтол ($\geq 99\%$), α -NA (1-нафтил ацетат, $\geq 98\%$), 2-нафтол ($\geq 99\%$), β -NA (2-нафтил ацетат), ρ -NPA (4-нитрофенил ацетат, $\geq 98.0\%$) – производство Sigma-Aldrich, Германия; Реактив Фолина–Чокалтеу – AppliChem, Италия; остальные реактивы (C_2H_3N , Na_2CO_3 , $NaOH$, $Na_3C_6H_5O_7$, $CuSO_4$, NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4) – марки ЧДА отечественного производства (ЗАО “Химприбор”, ООО “Компонент Реактив”, ООО “АО РЕАХИМ”).

Из особей *M. domestica* готовили индивидуальные гомогенаты с использованием стеклянной ступки и пестика, на холоде, с добавлением 0.1 М фосфатного буфера pH 7.6, содержащего 1 mM EDTA, 1 mM PTU, 1 mM PMSF, 1 mM DTE, 1% Triton X-100. Затем гомогенаты центрифугировали в течение 2 мин при 12500 об./мин. Полученные супернатанты использовали для определения эстеразной активности [21] и количественного определения белка по Лоури [22], используя БСА в качестве стандарта.

Ферментативную активность определяли по скорости гидролиза специфичного субстрата (α -NA, β -NA, p -NPA) [21] на микропланшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия). Для определения удельной ферментативной активности измерение проводили с использованием следующих концентраций соответствующих субстратов: 0.3 мМ α -NA, 0.3 мМ β -NA, 1 мМ p -NPA. Для установления кинетических параметров измерение активности проводили при 5-ти концентрациях каждого из субстратов.

При измерении активности CarE к гомогенатам добавляли соответствующий специфический субстрат (α -NA и β -NA соответственно) в фосфатном буфере (20 мМ pH 7.2). После 5-минутной инкубации при комнатной температуре реакцию останавливали при помощи 3% SDS с 0.3% Fast Blue и измеряли поглощение при 540 нм в режиме “конечная точка” [21, 23]. При измерении активности p -NPA-эстеразной активности к гомогенатам добавляли смесь p -NPA и фосфатного буфера (50 мМ pH 7.2). Измеряли поглощение при 405 нм, 30°C, в течение 5 мин с интервалом в 15 с в режиме “кинетики” [21]. Кинетические параметры (K_m , V_{max}) определяли путем построения графиков Лайнуивера–Берка на основании полученной эстеразной

активности по отношению к различным концентрациям специфических субстратов.

Статистический анализ результатов определения активности и кинетических параметров (K_m , V_{max}) карбоксилэстераз проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Тьюки–Крамера для множественных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что карбоксилэстеразная активность насекомых может варьировать в зависимости от использованного субстрата фермента, а в отношении одного и того же субстрата — в зависимости от вида [10, 24] и пола особей внутри одного вида [18]. В ходе настоящей работы для оценки активности и кинетических параметров эстераз (K_m , V_{max}) *M. domestica* было использовано 3 специфических субстрата: α -нафтил ацетат, β -нафтил ацетат и p -нитрофенил ацетат (рис. 1).

Данные соединения традиционно используют в качестве субстратов для измерения активности разных изоферментов эстераз [25].

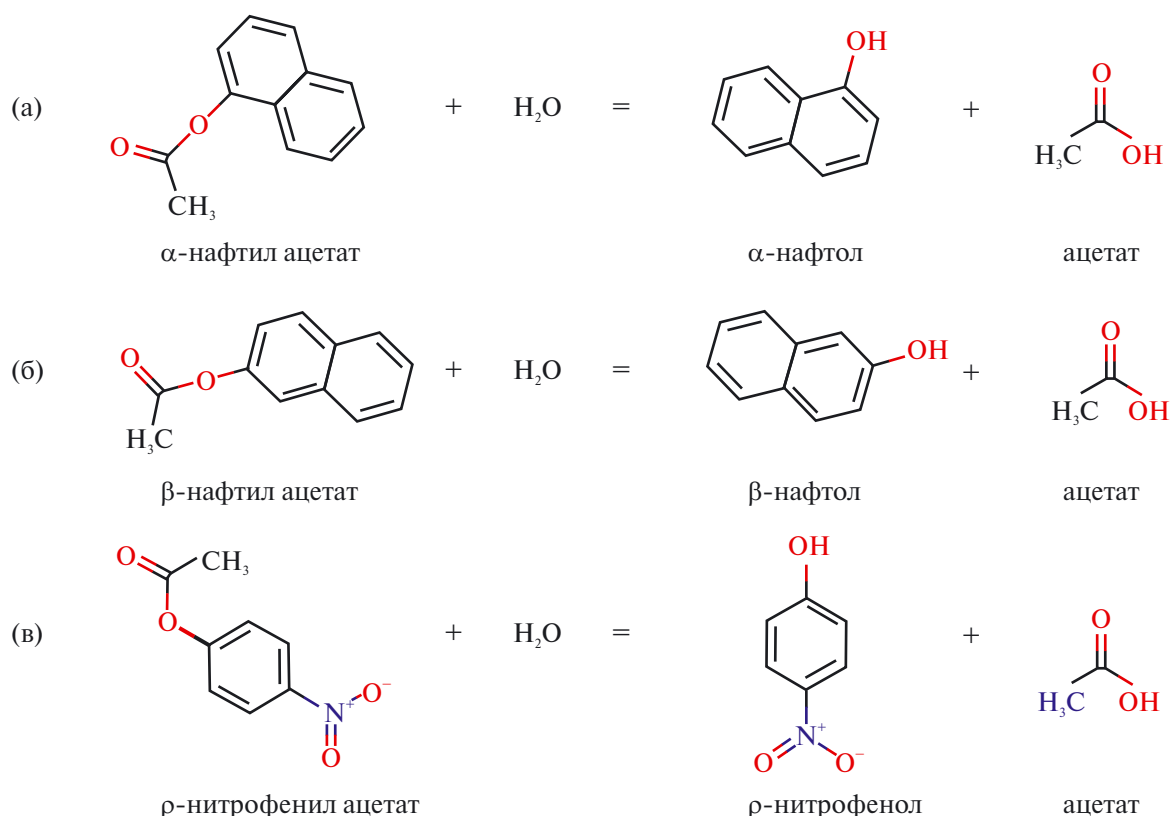


Рис. 1. Гидролиз карбоксилэстеразами различных субстратов: (а) — α -нафтил ацетат (α -NA), (б) — β -нафтил ацетат (β -NA), (в) — p -нитрофенил ацетат (p -NPA) [17].

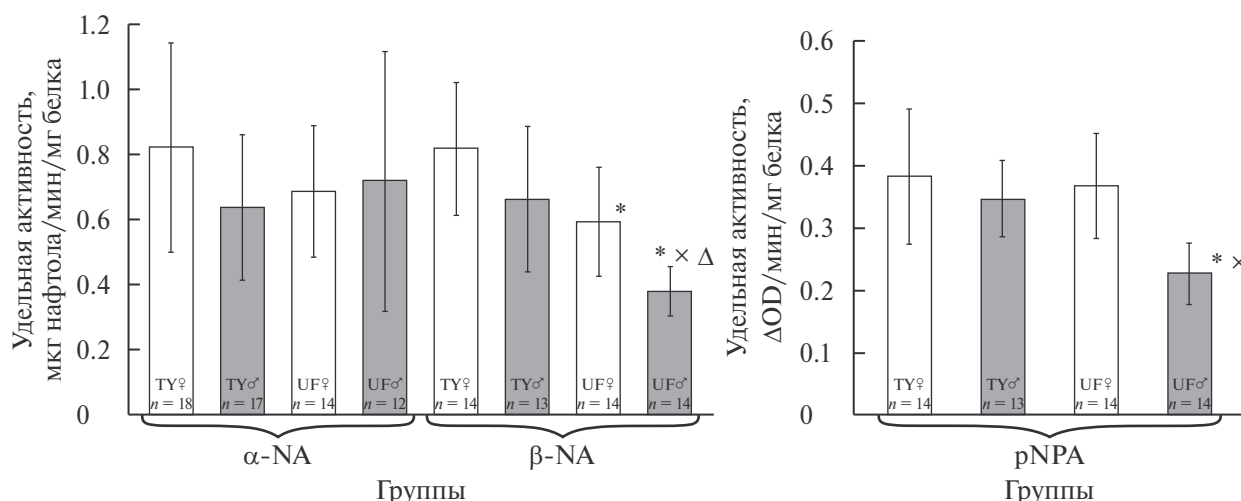


Рис. 2. Удельная активность карбоксилэстеразы имаго *Musca domestica* линий TY и UF в зависимости от субстрата фермента и пола насекомых ($m \pm SD$): m – среднее, SD – стандартное отклонение; α -NA – α -нафтил ацетат, β -NA – β -нафтил ацетат, p -NPA – p -нитрофенил ацетат; n – объем выборки, ΔOD – изменение оптической плотности; величины, статистическая значимость отличий согласно критерию Тьюки–Крамера ($p \leq 0.05$): * – между 2-мя линиями в пределах одного пола; × – между полами в пределах одной линии; Δ – в сравнении с α -NA-активностью особей аналогичной группы.

Наименьшие показатели удельной активности CarE независимо от использованного субстрата отмечены у самцов линии UF. Активность фермента в отношении β -NA и p -NPA у данной группы насекомых была в 1.75 и 1.53 раза соответственно меньше, чем у самцов линии TY. Также были отмечены статистически значимые отличия удельной активности CarE относительно β -NA и p -NPA между самками и самцами линии UF: у самцов активность была в 1.57 и 1.62 раза меньше. Удельная активность у самцов линии TY в отношении α -NA и β -NA была в 1.29 ($p = 0.30$) и в 1.24 ($p = 0.11$) раза соответственно меньше, чем у самок данной линии (рис. 2).

В нашем исследовании у особей линии TY величины K_m и V_{max} , полученные при использовании в качестве субстрата α -NA, были сопоставимы с показателями, полученными при использовании β -NA. У самок линии UF максимальная скорость гидролиза α - и β -NA не отличалась, а у самцов данной линии максимальная скорость гидролиза β -NA была в 2.14 раза меньше, чем α -NA ($p \leq 0.05$) (табл. 1).

Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимого варьирования величин кинетических параметров (K_m , V_{max}) между группами насекомых при использовании для измерения активности α -NA в качестве субстрата. В работе [20] при исследовании кинетических параметров α -NA- и β -NA-эстераз 2-х близкородственных видов муравьев (*Solenopsis invicta*, *S. richteri*) была отмечена статистически достоверная разница между кинетическими параметрами для α -NA разных колоний *S. invicta*, но не *S. richteri*.

Анализ кинетических параметров ферментов хлебного точильщика (*Stegobium paniceum*) и табачного жука (*Lasioderma serricorne*) показал, что у особей *S. paniceum* отмечена более высокая величина K_m и более низкая – V_{max} (ниже – каталитическая активность) при использовании субстрата α -NA, чем у *L. serricorne* ($p \leq 0.05$) [9].

Статистически достоверных отличий K_m при определении активности β -NA-эстеразы в ходе исследования обнаружено не было (табл. 1). Выявлены межполовые и межпопуляционные статистически значимые отличия V_{max} . Величина V_{max} CarE самцов линии UF была меньше, чем самок той же линии в 1.57 раза ($p \leq 0.05$). Фермент особей линии UF характеризовался меньшей скоростью гидролиза β -NA. Величины V_{max} фермента самок и самцов линии UF были в 1.37 и в 1.90 раза ($p \leq 0.05$) соответственно меньше, чем особей того же пола линии TY. Полученные результаты соответствуют данным других авторов. В уже упоминавшемся исследовании [20] для β -NA было отмечено статистически достоверное варьирование кинетических параметров фермента между колониями *S. invicta*, у другого вида (*S. richteri*) такие отличия не обнаружили. При изучении кинетических параметров β -NA-эстеразы у 6-ти рас тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) самая высокая и низкая величина K_m отмечена у рас PMX (0.1175 mM) и AP 12 (0.0368 mM) соответственно, максимальная V_{max} была отмечена у расы Hosa Mysore (0.25 mM/мин), минимальная – MU-1 (0.0539 mM/мин) [19]. В отношении p -NPA-эстеразы было отмечено, что у самок линии UF величина K_m была наименьшей: меньше,

Таблица 1. Кинетические параметры карбоксилэстераз имаго *Musca domestica* L. ($m \pm SD$).

Линия	Пол	<i>n</i>	<i>K_m</i> , мМ	<i>V_{max}</i> , мкг нитрофенола/мин/мг белка
α -NA				
TY	♀	10	0.037 ± 0.021	0.933 ± 0.382
	♂	12	0.047 ± 0.036	0.771 ± 0.357
UF	♀	13	0.023 ± 0.006	0.682 ± 0.216
	♂	13	0.032 ± 0.016	0.814 ± 0.457
β -NA				
TY	♀	14	0.032 ± 0.011	0.814 ± 0.185
	♂	11	0.040 ± 0.013	0.721 ± 0.187
UF	♀	14	0.036 ± 0.020	$0.596 \pm 0.162^{* \times}$
	♂	14	0.034 ± 0.016	$0.380 \pm 0.085^{* \Delta}$
ρ -NPA				
Линия	Пол	<i>n</i>	<i>K_m</i> , мМ	<i>V_{max}</i> , ΔOD /мин/мг белка
TY	♀	14	0.352 ± 0.228	0.477 ± 0.160
	♂	12	0.286 ± 0.153	0.388 ± 0.088
UF	♀	10	0.177 ± 0.086	0.395 ± 0.093
	♂	11	0.376 ± 0.177	0.302 ± 0.099

Примечание: *m* — среднее, *SD* — стандартное отклонение; TY, UF — разные линии *Musca domestica*, *n* — объем выборки, ΔOD — изменение оптической плотности, величины, статистическая значимость отличий согласно критерию Тьюки–Крамера ($p \leq 0.05$): * — между 2-мя линиями в пределах одного пола, $\times$ — между полами в пределах одной линии, Δ — в сравнении с α -NA-активностью особей аналогичной группы.

чем у самцов той же линии в 2.12 раза и чем у самок TY-линии — в 1.99 раза (табл. 1). Анализ величин *V_{max}* не выявил межпопуляционных и межполовых отличий. Ранее в результате исследования кинетических параметров серинэстеразы EST-4 2-х близкородственных видов дрозофил (*Drosophila mulleri*, *D. arizonae*) выявлено, что при использовании субстрата ρ -NPA величина *K_m* была намного меньше у *D. mulleri* (0.17 мМ), чем у *D. arizonae* (0.74 мМ). Однако, хотя сродство EST-4 к этому субстрату у *D. mulleri* было намного больше, его максимальная скорость была в 20 раз меньше (0.94 мМ/мин), чем у *D. arizonae* (19.33 мМ/мин) [24].

Варьирование кинетических параметров свидетельствуют о разном сродстве фермента к субстрату, эффективности его утилизации и скорости ферментативного гидролиза у разных линий или рас насекомых [19]. Такое варьирование может быть обусловлено особенностями среды обитания. Например, кинетические исследования эстераз с использованием субстратов α - и β -NA у 3-х популяций кузнечиков *Oxya chinensis* из сред с разной интенсивностью и продолжительностью воздействия малатиона показали, что величины *K_m* были близкими, а величины *V_{max}* варьировали у самок и самцов в 3-х популяциях. Показатели *V_{max}* самок были больше, чем у самцов в популяциях BD

(Baodi: высокая интенсивность воздействия ранее, но низкая в настоящее время) и JN (Jinnan: высокая интенсивность воздействия), тогда как в популяции BDG (Beidagang: низкая интенсивность воздействия) величины *V_{max}* самцов были больше, чем самок со всеми субстратами [18].

Для многих ферментов насекомых характерен половой диморфизм и изменение активности в онтогенезе. Например, в ряде работ представлены данные о том, что у самок дрозофилы (*D. melanogaster*) активность ацетилхолинэстеразы меньше, чем у самцов [26, 27]. В исследовании [28] по оценке возрастных изменений гексоизомеразной, эстеразной, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназной и фосфатазной активностей у *D. melanogaster* было показано, что эстеразная активность с возрастом увеличивалась, при этом у самцов обнаружено более значительное увеличение активности с возрастом (в 2.6 раза по сравнению с молодыми самцами), чем у самок (в 1.5 раза по сравнению с молодыми самками). В нашем исследовании отличия характеристик CarE в зависимости от пола выявлены как у особей линии UF (β -NA-эстеразная и ρ -NPA-эстеразная активности самцов были меньше).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты определения кинетических параметров эстеразной активности имаго *Musca domestica* L. указывали на наличие межпопуляционных различий у 2-х лабораторных линий (ТУ и UF). У особей линии ТУ скорости гидролиза двух субстратов (α - и β -NA) не различались статистически значимо (как самок, так и самцов), в то время как у особей линии UF скорость гидролиза разных субстратов отличалась в зависимости от пола: у самцов скорость гидролиза β -NA была меньше, чем скорость гидролиза α -NA. У особей линии UF отмечены статистически значимые отличия величин $V_{\max}$ и удельной β -NA-эстеразной активности и ρ -NPA-эстеразной активности в зависимости от пола, что не обнаружено у представителей линии ТУ. О межпопуляционных различиях свидетельствовали также меньшие величины максимальной скорости гидролиза β -NA ферментом особей линии UF относительно данного параметра особей линии ТУ.

Полученные результаты позволили определить наиболее подходящий субстрат для выявления межполовых и межпопуляционных особенностей активности и кинетических параметров эстераз насекомых на примере *M. domestica*. Поскольку при использовании в качестве субстрата α -NA были получены более стабильные результаты, то данный субстрат предпочтителен для измерения ферментативной активности карбоксилэстеразы модельных насекомых *M. domestica* разных линий. В дальнейшей работе необходимо оценить, будут ли сохраняться обнаруженные особенности активности кинетических параметров фермента при остром и хроническом воздействии инсектицидами на имаго *M. domestica*, а также выявить оптимальный субстрат CarE для обнаружения сублетальных эффектов инсектицидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sparks T.C., Crossthwaite A.J., Nauen R., Banba S., Cordova D., Earley F., Ebbinghaus-Kintscher U., Fujioaka S., Hirao A., Karmon D., Kennedy R., Nakao T., Popham H.J.R., Salgado V., Watson G.B., Wedel B.J., Wesels F.J. Insecticides, biologics and nematocides: Updates to IRAC's mode of action classification — A tool for resistance management // *Biochem. Physiol.* 2020. V. 167. 104587. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104587>
2. Shah R.M., Shad S.A. Genetics and mechanism of resistance to chlorantraniliprole in *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) // *Ecotoxicology*. 2021. V. 30. P. 552–559. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02390-w>
3. Bass C., Jones M. Editorial overview: Pests and resistance: Resistance to pesticides in arthropod crop pests and disease vectors: mechanisms, models and tools // *Curr. Opin. Insect Sci.* 2018. V. 27. P. 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.009>
4. Scott J.G., Warren W.C., Beukeboom L.W. Genome of the house fly, *Musca domestica* L., a global vector of diseases with adaptations to a septic environment // *Genome Biol.* 2014. V. 15(10). 466. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0466-3>
5. Давлианидзе Т.А., Еремина О.Ю., Олифер В.В. Резистентность к инсектицидам комнатной мухи *Musca domestica* в центре европейской части России // *Вестн. защиты раст.* 2022. Т. 105. № 3. С. 114–121. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-3-15346>
6. Jensen S.E. Insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* // *Integrat. Pest Manag. Rev.* 2000. V. 5. P. 131–146. <https://doi.org/10.1023/A:1009600426262>
7. Oakeshott J.G., van Papenrecht E.A., Boyce T.M., Healy M.J., Russell R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila esterases* // *Genetica*. 1993. V. 90. P. 239–268. <https://doi.org/10.1007/BF01435043>
8. Gao M., Mu W., Wang W., Zhou C., Li X. Resistance mechanisms and risk assessment regarding indoxacarb in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* // *Phytoparasitica*. 2014. V. 42. P. 585–594. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0396-3>
9. Li C., Li Z.Z., Cao Y., Zhou B., Zheng X. Partial characterization of stress-induced carboxylesterase from adults of *Stegobium paniceum* and *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae) subjected to CO₂-enriched atmosphere // *J. Pest. Sci.* 2009. V. 82. P. 7–11. <https://doi.org/10.1007/s10340-008-0221-1>
10. Zou C.S., Cao C.W., Zhang G.C., Wang Z.Y. Purification, characterization, and sensitivity to pesticides of carboxylesterase from *Dendrolimus superans* (Lepidoptera: Lasiocampidae) // *J. Insect Sci.* 2014. V. 14(260). P. 1–6. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieul22>
11. Bai L.S., Zhao C.X., Xu J.J., Feng C., Li Y.Q., Dong Y.L., Ma Z.Q. Identification and biochemical characterization of carboxylesterase 001G associated with insecticide detoxification in *Helicoverpa armigera* // *Pest. Biochem. Physiol.* 2019. V. 157. P. 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.009>
12. Yin F., Ma W., Li D., Zhang X., Zhang J. Expression and kinetic analysis of carboxylesterase LmCesA1 from *Locusta migratoria* // *Biotechnol. Lett.* 2021. V. 43. P. 995–1004. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03086-1>
13. Feng X., Liu N. Functional analyses of house fly carboxylesterases involved in insecticide resistance // *Front. Physiol.* 2020. V. 11. 595009. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.595009>
14. Zhang Y., Guo M., Ma Z., You C., Gao X., Shi X. Esterase-mediated spinosad resistance in house flies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) // *Ecotoxicology*. 2020. V. 29. P. 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02125-y>
15. Carvalho S.M., Belzunces L.P., Carvalho G.A., Brunet J.L., Badiou-Beneteau A. Enzymatic biomarkers as tools to as-

- sess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides // Environ. Toxicol. Chem. 2013. V. 32. P. 2117–2124. <https://doi.org/10.1002/etc.2288>
16. Wei D.D., He W., Miao Z.Q., Tu Y.Q., Wang L., Dou W., Wang J.J. Characterization of esterase genes involving malathion detoxification and establishment of an RNA interference method in *Liposcelis bostrychophila* // Front. Physiol. 2020. V. 11. P. 274. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00274>
 17. BRENDA Enzyme Database – URL: <https://www.brenda-enzymes.org/> (дата обращения: 21.06.2023).
 18. Wu H., Yang M., Guo Y., En-bo M.A. The Susceptibilities of *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea) to malathion and comparison of the esterase properties from three collected populations in Tianjin Area, China // Agricult. Sci. China. 2009. V. 8(1). V. 76–82. [https://doi.org/10.1016/s1671-2927\(09\)60011-0](https://doi.org/10.1016/s1671-2927(09)60011-0)
 19. Vishnu Priya S., Somasundaram P. Bio-molecular characterization of stress enzyme profile on esterase in selected silkworm races of *Bombyx mori* (L.) for biomarker selection // Adv. Biomarker Sci. Technol. 2019. V. 1. P. 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.abst.2019.05.002>
 20. Chen J., Rashid T., Feng G. Esterase in imported fire ants, *Solenopsis invicta* and *S. richteri* (Hymenoptera: Formicidae): Activity, kinetics and variation // Sci. Rep. 2014. V. 4(7112). <https://doi.org/10.1038/srep07112>
 21. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Ministry of Health of Brazil, Fundação Oswaldo Cruz. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 128 p.
 22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193(1). P. 265–275.
 23. Abdel-Aal Y.A.I., Lampert E.P., Wolff M.A., Roe R.M. Novel substrates for the kinetic assay of esterases associated with insecticide resistance // Experientia. 1993. V. 49. P. 571–575. <https://doi.org/10.1007/BF01955166>
 24. Lopes V.F., Cabral H., Machado L.P., Mateus R.P. Purification and characterization of a specific late-larval esterase from two species of the *Drosophila repleta* group: contributions to understand its evolution // Zool. Stud. 2014. V. 53(6). <https://doi.org/10.1186/1810-522X-53-6>
 25. Milone J.P., Rinkevich F.D., McAfee A., Foster L.J., Tarry D.R. Differences in larval pesticide tolerance and esterase activity across honey bee (*Apis mellifera*) stocks // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2020. V. 206. 111213. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111213>
 26. Khatuna S., Mandia M., Rajakb P., Roy S. Interplay of ROS and behavioral pattern in fluoride exposed *Drosophila melanogaster* // Chemosphere. 2018. V. 209. P. 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.074>
 27. Hu X., Fu W., Yang X., Mu Y., Gu W., Zhang M. Effects of cadmium on fecundity and defence ability of *Drosophila melanogaster* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 171. P. 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.029>
 28. Hall J.C. Age-dependent enzyme changes in *Drosophila melanogaster* // Exp. Gerontol. 1969. V. 4. P. 207–222.

Activities and Kinetic Parameters of Carboxylesterases in Model Insects depending on a Substrate of the Enzyme

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

^aAll-Russian Scientific Research Institute of Veterinary Entomology and Arachnology – Branch of Federal State Institution Federal Research Centre Tyumen Scientific Centre of Siberian Branch of the RAS, ul. Institutskaya 2, Tyumen 625041, Russia

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

House flies *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) serve as a common model organism for testing of insecticides and research of insecticidal resistance mechanisms in insects. One of important stages is to assess of detoxifying enzyme activities including carboxylesterase activities (CarE). In this study, we compared specific activities and kinetic parameters (V_{max} and K_m) of CarE in adults *M. domestica* of two laboratory strains (TY, UF) depending on the enzymatic substrate used. The specific CarE activities towards α - and β -naphthyl acetate (α -NA and β -NA) were similar in both males and females of the TY strain. In males of the UF strain, the value of the specific and the maximal velocity (V_{max}) of β -NA hydrolysis was 1.90- and 1.57-fold respectively less than that of α -NA; this difference was not observed in females of the same strain. Some characteristics of CarE varied depending on sex of insects when p-nitrophenyl acetate was used as an enzymatic substrate. In particular, the specific activity was 1.62-fold less in males of the UF strain compared to this value in females. The activity and main kinetic parameters of CarE towards α -NA not differed statistically significant depending on sex and the strains. Based on the results obtained we suggest that α -naphthyl acetate is the preferred substrate to evaluate the CarE enzymatic activity in the model insect *M. domestica* of different strains.

Keywords: insects, *Musca domestica* L., insecticide detoxification, kinetic parameters, Michaelis constant, maximal velocity of reaction.