

УДК 595.729; 593.195; 593.192.1; 577.158

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРОСПОРИДИИ
NOSEMA GRYLLI И КОКЦИДИИ ADELINA SP. НА РАЗВИТИЕ
ЯИЧНИКОВ И АКТИВНОСТЬ ТРЕХ ДЕГИДРОГЕНАЗ
В ЖИРОВОМ ТЕЛЕ САМОК СВЕРЧКОВ GRYLLUS BIMACULATUS

© В. В. Долгих, М. В. Григорьев, Ю. Я. Соколова, И. В. Исси

Изучение веса яичников у контрольных и зараженных микроспоридией *Nosema grylli* девственных самок сверчков *Gryllus bimaculatus* показало сильное подавление развития репродуктивной системы при микроспоридиозе. У инвазированных микроспоридиями сверчков наблюдается также гипертрофия жирового тела. Вместе с тем заражение кокцидией *Adelina sp.* не оказывает значительного влияния на развитие яичников и размеры жирового тела. С целью сравнительного изучения влияния паразитов на метаболические процессы хозяина спектрофотометрическим методом были определены удельные активности трех дегидрогеназ в жировом теле самок: цитоплазматических форм НАД-зависимой малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37), малик-энзима (КФ 1.1.1.40) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49). У незараженных особей наблюдается значительное увеличение удельной активности данных ферментов на 2–3-й дни после линьки на имаго. В дальнейшем активность изменяется незначительно. При микроспоридиозе в жировом теле самок в возрасте от 2 до 23 дней наблюдается снижение в среднем в 1.5 раза удельной активности малатдегидрогеназы, в 2.6 раза малик-энзима и в 1.3–1.4 раза глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Заражение кокцидией *Adelina sp.* вызывает незначительное снижение удельной активности малатдегидрогеназы и не оказывает достоверного влияния на активность малик-энзима и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у самок того же возраста. Проводится сопоставление данных о влиянии паразитов на развитие яичников и активность ферментов в жировом теле сверчков.

В клетках жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus* паразитируют два вида простейших: микроспоридия *Nosema grylli* и кокцидия *Adelina sp.* Заражение клеток одной ткани паразитами из разных типов подцарства Protozoa позволяет рассматривать сверчков в качестве удобного объекта для сравнительного изучения паразито-хозяйинных отношений при микроспоридиозе и кокцидиозе.

Микроспоридии и кокцидии отличаются способом проникновения в инвазируемую клетку. Подавляющее большинство видов микроспоридий существует в непосредственном контакте с цитоплазмой клетки хозяина, тогда как кокцидии развиваются внутри паразитофорной вакуоли. Отсутствие митохондрий и запасных питательных веществ у микроспоридий и наличие их у кокцидий свидетельствуют о значительных отличиях в метаболизме паразитов. Это позволяет предположить различный характер воздействия микроспоридий и кокцидий на инвазируемую клетку и организм хозяина в целом.

При заражении сверчков микроспоридией *Nosema grylli* мы наблюдали сильную гипертрофию жирового тела (Соколова и др., 1994) и подавление развития яичников у самок. Вместе с тем кокцидия *Adelina sp.* не вызывает гипертрофии жирового тела и не оказывает заметного влияния на развитие репродуктивной системы

самок. С нашей точки зрения, представляет интерес сравнить воздействие этих паразитов на метаболические процессы в жировом теле сверчков и сопоставить с данными о различном их влиянии на развитие яичников.

В данной работе изучено изменение удельных активностей трех дегидрогеназ: цитоплазматических форм НАД-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ) (КФ 1.1.1.37), НАДФ-зависимой, декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (малик-энзима) (КФ 1.1.1.40), и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) в жировом теле девственных самок сверчков *Gryllus bimaculatus* при заражении микроспоридией *Nosema grylli* и кокцидией *Adelina* sp. Указанные ферменты принимают участие в процессах синтеза жирных кислот в цитоплазме клетки. Малик-энзим и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа катализируют образование восстановленной формы НАДФ. МДГ способствует образованию в цитоплазме ацетил-КоА, участвуя во взаимопревращении цитрата и малата после переноса их через митохондриальную мембрану, а также поставляет малат для реакции катализируемой малик-энзимом. Кроме того, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа как ключевой фермент пентозо-фосфатного пути участвует в образовании рибозо-5-фосфата, необходимого для синтеза нуклеотидов. МДГ и малик-энзим могут играть важную роль в глюконеогенезе, участвуя в превращении пирувата в фосфоенолпируват. Указанные биосинтетические процессы, вероятно, играют важную роль в образовании соединений, необходимых для развивающихся яичников и других органов сверчков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили сверчки *Gryllus bimaculatus* из лабораторных популяций, поддерживаемых в инсектарии ИЭФиБ им. И. М. Сеченова. Насекомых содержали в условиях, сходных с описанными для инсектария ИЭФиБ (Князев, 1985). Личинок второго и третьего возрастов заражали микроспоридиями, добавляя в воду и на зеленый корм суспензию зрелых спор из расчета приблизительно 10^6 спор на особь. Процедуру повторяли несколько раз с недельным интервалом. Сверчков инвазированных кокцидиями получали из естественно зараженной популяции. Интенсивность инвазии оценивали микроскопированием препаратов жирового тела.

Отпрепарированные яичники взвешивали сразу после вскрытия, а жировое тело промывали в 10 мМ трис-НСl (рН 7.8), 150 мМ NaCl и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при добавлении 100 мМ трис-НСl буфера (рН 7.8), содержащего 0.3 мМ сахарозу, 25 мМ KCl, 0.5 мМ PMSF, 0.5 мМ ДДТ. Гомогенат центрифугировали при 200 g 10 мин для удаления стадий развития паразитов. Супернатант центрифугировали при 6000 g 30 мин и надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов. Все операции проводили при +4°. Осаждение митохондрий контролировали с помощью измерения активности сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1).

Активность изучаемых ферментов определяли спектрофотометрическим методом в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при длине волны 340 нм и температуре 37°. Реакционная смесь для определения активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы содержала: 50 мМ трис-НСl (рН 7.8), 1 мМ ЩУК, 0.125 мМ НАДН- Na_2 , пробу, содержащую 0.5 и 1 мкг белка. Контрольная смесь не содержала щавелево-уксусной кислоты. Реакционная смесь для определения активности малик-энзима содержала: 50 мМ трис-НСl (рН 7.8), 0.3 мМ MnCl_2 , 1.25 мМ D,L-малат, 0.05 мМ НАДФ-Na, пробу, содержащую 20 и 40 мкг белка. Контрольная смесь не содержала D,L-малат. Реакционная смесь для определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы содержала: 50 мМ трис-НСl (рН 7.8), 5 мМ MgSO_4 , 1.25 мМ

Удельная активность ферментов в жировом теле контрольных и зараженных самок сверчков нмоль/мин · мг белка

Specific activity of enzymes in fat body of infected and noninfected crickets (nmole/min · mg protein)

Вариант	МДГ	малик-энзим	глюкозо-6-ФДГ
Контроль	1583 ± 66 (34)	76.5 ± 6.2 (45)	261 ± 24 (34)
Заражение			
кокцидиями	1377 ± 61 (21)	76.6 ± 7.3 (27)	282 ± 36 (23)
микроспоридиями	1057 ± 50 (17)	29.1 ± 2.4 (25)	194 ± 18 (21)

Примечание. В скобках указано количество независимо исследованных особей.

глюкозо-6-фосфат- Na_2 , 0.1 мМ НАДФ- Na , пробу, содержащую 20 и 40 мкг белка. Контрольная смесь не содержала глюкозо-6-фосфат- Na_2 . Коэффициент дифференциальной молярной экстинкции НАД (НАДФ) и НАДН (НАДФН) при данной длине волны принимали равным $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

В таблице и на графиках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Графики построены на основании независимого изучения 5–10 особей для каждой точки. Достоверность различий между выборками определяли при помощи критерия Фишера ($p < 0.001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение активности сукцинатдегидрогеназы в осадке и супернатанте показало, что при указанном режиме центрифугирования (6000 г, 30 мин) происходит осаждение митохондрий. Таким образом, в работе измерялись активности цитоплазматических форм МДГ и малик-энзима. Метаболические процессы в жировом теле насекомых в значительной степени связаны с линькой, формированием репродуктивной системы, размножением, работой летательного аппарата и т. д. Поэтому в первую очередь была изучена удельная активность ферментов в жировом теле контрольных самок в различные сроки после линьки на имаго (рис. 1). Результаты показали, что наблюдается достоверное увеличение удельной активности ферментов на 2–3-й дни после линьки по сравнению с первым днем. В дальнейшем активность изменяется незначительно. Исходя из этого для изучения влияния заражения на указанные показатели были использованы самки в возрасте от 2 до 23 дней.

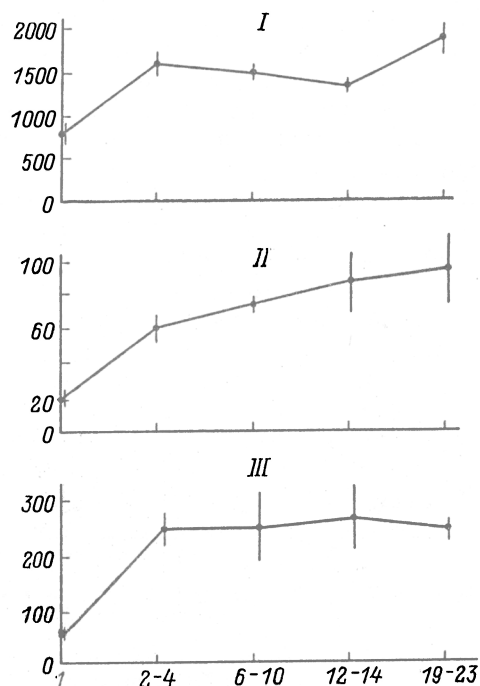
Исследование показало снижение удельной активности изученных ферментов в жировом теле самок, зараженных микроспоридией *Nosema grylli* (см. таблицу). Удельная активность была ниже в среднем в 1.5 раза для МДГ, в 2.6 раза для малик-энзима и в 1.3–1.4 раза для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по сравнению с контролем. В жировом теле сверчков, зараженных кокцидией *Adelina* sp., наблюдается незначительное снижение активности МДГ и не выявлено достоверных отличий от контроля для малик-энзима и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Данные, полученные при изучении веса яичников у контрольных и зараженных самок (рис. 2), показали значительное подавление развития репродуктивной

Рис. 1. Удельная активность МДГ, малик-энзима и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в жировом теле незараженных самок сверчков разного возраста.

I — МДГ; II — малик-энзим; III — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; по оси ординат — удельная активность ферментов (нмоль/мин·мг белка); по оси абсцисс — возраст сверчков (дни после линьки на имаго).

Fig. 1. Specific activity of Malatdehydrogenase (MDH), malic-enzyme (ME) and glucose-6-phosphatdehydrogenas (G-6-PDH) in fat bodies of uninfected females of different instars.



системы при микроспориidioзе. Следует отметить, что этот процесс сопровождается гипертрофией жирового тела. Вместе с тем при заражении кокцидией *Adelina* sp. мы не наблюдали заметного влияния на развитие яичников.

ОБСУЖДЕНИЕ

Более низкие значения удельной активности ферментов у контрольных самок в первый день после линьки на имаго могут быть связаны с повышенным содержанием резервных белков в клетках жирового тела. Однако следует отметить, что для каждого фермента активность с возрастом изменяется в неодинаковой степени. Удельная активность увеличивается на 2-4-й дни в среднем в 4 раза для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и в 2 раза — для МДГ (рис. 1). В то же время мы не обнаружили увеличения удельной активности алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) в жировом теле контрольных самок на 2-10-й дни после линьки по сравнению с первым днем (полные данные по ферменту будут опубликованы позже). С нашей точки зрения, потребление резервных белков жирового тела может лишь частично обуславливать возрастание удельной активности ферментов.

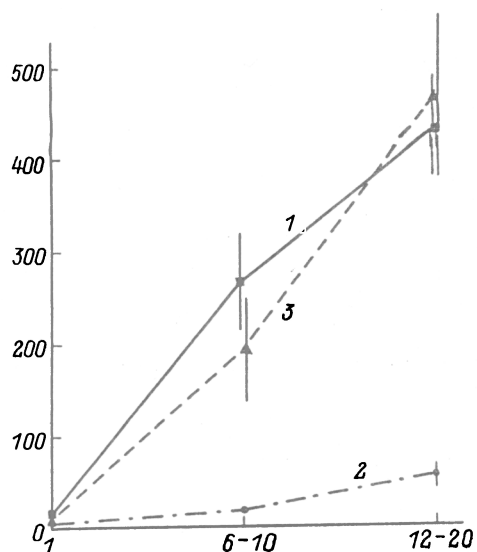


Рис. 2. Вес яичников у незараженных и зараженных самок сверчков.

1 — контроль; 2 — заражение микроспориidioзой *Nosema grylli*; 3 — заражение кокцидией *Adelina* sp.; по оси ординат — вес яичников (мг); по оси абсцисс — возраст сверчков (дни после линьки на имаго).

Fig. 2. Ovaries' weight in uninfected and infected females.

Наблюдаемое увеличение, вероятно, связано с повышением интенсивности биосинтетических процессов в жировом теле. Синтезируемые и запасаемые в жировом теле белки, углеводы, липиды и другие соединения используются для развития репродуктивной системы, работы мышц и других процессов в организме насекомого. При этом липиды являются главным источником энергии как для развития яиц и эмбрионов, так и для сокращения крыловой мускулатуры (Тыщенко, 1976). В гемолимфе сверчка *Acheta domesticus* наблюдается значительное увеличение содержания липидов в первые дни развития имаго, достижение максимума на 5–10-й дни и в дальнейшем снижение их концентрации. В то же время наиболее высокое содержание белка и аминокислот наблюдается в гемолимфе личинок двух последних возрастов и у имаго в возрасте до одного дня (Nowosielski, Patton, 1965).

Снижение удельной активности изученных ферментов при микроспориidioзе может быть связано с подавлением развития яичников. Удаление яичников у колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* вызывает гипертрофию клеток жирового тела, сопровождающуюся накоплением гранул гликогена и жировых капель (Дудаш, 1978). С другой стороны, воздействие микроспоридий на обменные процессы в жировом теле может отразиться на развитии репродуктивной системы. Снижение удельной активности за счет накопления в цитоплазме значительного количества специфичных для зараженной клетки белков, с нашей точки зрения, маловероятно. Электрофорез в присутствии ДСН растворимых белков жирового тела сверчков не выявил значительных изменений при заражении микроспоридиями, за исключением накопления белка с молекулярным весом около 110 kD (Selesnjov e. a., 1995).

Наиболее значительное снижение активности при заражении микроспоридией *Nosema grylli* наблюдается для малик-энзима. Следует отметить, что цитоплазматическая форма малик-энзима принимает участие в синтезе жирных кислот. Исчезновение капель жира в клетках жирового тела личинок *Trichoplusia ni* при заражении микроспоридией *Vairimorpha necatrix*, позволяет предположить использование липидов микроспоридиями в качестве источника энергии (Darwish e. a., 1989). Мы также наблюдали снижение содержания липидных капель в жировом теле сверчков при развитии микроспоридии *Nosema grylli*. Однако отсутствие митохондрий у микроспоридий позволяет предположить, что они не могут использовать жирные кислоты в качестве источника энергии. В инвазированных клетках жирового тела может иметь место замедление липогенеза, а также ускорение процессов окисления жирных кислот. Это согласуется с представленными в работе данными о снижении удельной активности цитоплазматических форм малик-энзима и МДГ.

Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижается при микроспориidioзе в наименьшей степени. Возможно, это связано с биосинтезом зараженной клеткой пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов с целью обеспечения размножения микроспоридий. В литературе описаны многочисленные факты, свидетельствующие о зависимости между активностью ферментов пентозо-фосфатного пути (в частности, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) и интенсивностью нуклеинового обмена (Кудрявцева, 1978).

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, № 94-04-12972).

Список литературы

- Дудаш А. В. Морфофункциональные особенности жирового тела насекомых с полным и неполным превращением // Усп. соврем. биол. 1978. Т. 85, вып. 1. С. 125–133.
- Князев А. Н. Цикл развития сверчка *Gryllus bimaculatus*, 1985 Deg. (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания // Энтотомол. обозр. 1985. Т. 64, вып. 1. С. 58–73.
- Кудрявцева Г. В. Пентозофосфатный путь (ПФП) и его взаимосвязь с метаболизмом нуклеиновых кислот // Усп. соврем. биол. 1978. Т. 85, вып. 1. С. 3–17.
- Соколова Ю. Я., Селезнев К. В., Долгих В. В., Исси И. В. Микроспоридия *Nosema grylli* n. sp. из сверчков *Gryllus bimaculatus* // Паразитология. 1994. Т. 28, вып. 6. С. 488–493.
- Тыщенко В. П. Основы физиологии насекомых. Ч. 1. Л.: Изд-во ЛГУ, 1976. 362 с.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1979. Vol. 72. P. 248–254.
- Darwish A., Weidner E., Fuxa J. *Vairimorpha necatrix* in adipose cells of *Trichoplusia ni* // J. Protozool. 1989. Vol. 36. P. 308–311.
- Nowosielski J. W., Patton R. L. Variation in the haemolymph protein, amino acid, and lipid levels in adult house crickets, *Acheta domesticus* L., of different ages // J. Ins. Physiol. 1965. Vol. 11. P. 263–270.
- Selesnjov K., Issi I., Dolgikh V., Belostotskaya G., Antonova O., Sokolova J. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by centrifugation in percoll density gradient for biochemical research // J. Euk. Microbiol. 1995. Vol. 42 (3). P. 288–292.

Всероссийский институт защиты растений
Санкт-Петербург, Пушкин,
189620

Поступила 15.06.1995

INFLUENCE OF THE MICROSPORIDIA NOSEMA GRYLLI AND THE COCCIDIA ADELINA SP. ON THE OVARY DEVELOPMENT AND ON THE ACTIVITIES OF THREE DEHYDROGENASES IN FAT BODY OF FEMALE CRICKETS GRYLLUS BIMACULATUS

V. V. Dolgikh, M. V. Grigoriev, Yu. Ya. Sokolova, I. V. Issi

Key words: *Gryllus bimaculatus*, coccidiosis, microsporidiosis, ovaries, dehydrogenases.

SUMMARY

Fat body of *Gryllus bimaculatus* is being infected with two intracellular parasites *Nosema grylli* (Microsporidia) (M) and *Adelina* sp. (Coccidia) (C). It is known that M penetrate inside host cells through the polar filament, develop without a parasitophorous vacuole (at least *Nosema*-species), do not possess mitochondria and any visualized nutrients. C invade host cells by induced endocytosis, develop inside a vacuole, possess mitochondria and store nutrients in special granules. We noticed that infection with M (in contrast to C) suppressed the development of the female reproductive system of crickets. We suppose that all mentioned peculiarities should evolve a specific influence of M and C on the metabolic processes of hosts, especially in such crucial and energy-consuming period of their life as an ovary maturation.

Measuring showed that infection with M caused prominent reducing of gonad weight in virgin females and a simultaneous hypertrophy of their fat bodies. None of these effects was caused by C. Specific activities of 3 dehydrogenases: (1) cytoplasmic forms of NAD-dependant malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (MDH), (2) malic-enzyme (EC 1.1.1.40) (ME) and (3) glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (G-6-PDH) were measured spectrophotometrically in cricket fat bodies infected with two parasites. M caused a decrease of activities of studied enzymes in fat bodies of 2–23 day females: activity of MDH reduced in 1.5 times; ME – in 2.6; G-6-PDH – in 1.3–1.4, comparatively with the control. Infection with C led to a slight decrease of MDH activities and didn't cause statistically significant alterations in activities of ME and G-6-PDH. We suppose that lowering of enzyme activities is connected with suppressing of gonad development by M.