

УДК 632.937.01 : 593.195/616-092

**ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭСТЕРАЗ
КАК ОСОБЕННОСТЬ ПАТОГЕНЕЗА МИКРОСПОРИДИОЗА СВЕРЧКОВ
GRYLLUS BIMACULATUS**

© Ю. Я. Соколова, О. В. Сундуков

Проведено сравнительное изучение карбоксилэстераз (КЭ) в различных органах сверчков *Gryllus bimaculatus* в норме и при заражении микроспоридией *Nosema grylli*. В гемолимфе активность эстераз определялась спектрофотометрически, а в гемолимфе, жировом теле и нервной цепочке — методом специфического окрашивания КЭ после электрофоретического разделения в полиакриламидном геле и инкубации в растворах, содержащих гидролизуемые ими субстраты. В монослоях гемоцитов активность эстераз изучалась цитохимическими методами. Результаты исследований показали ингибирование активности при микроспориidioзах во всех изученных тканях. Одним из следствий общего снижения активности эстераз может быть повышение титра ЮГ при микроспориidioзах и наблюдаемая «ювенилизация» зараженных особей. Заражение жирового тела сверчков другим внутриклеточным паразитом — кокцидией *Adelina grylli* не вызывало снижения активности фермента, а, напротив, усиливало активность отдельных множественных молекулярных форм эстераз.

Карбоксилэстеразы (КЭ) (неспецифические эстеразы) — ферменты, гидролизующие эфиры карбоновых кислот. Идентификация отдельных типов этих ферментов (КФ 3.1.1.1.—3.1.1.5.) затруднена из-за их широкой и перекрывающейся субстратной специфичности, а также тем, что их ингибиторная чувствительность определяется составом субъединиц множественных молекулярных форм фермента (Choudhury, 1972). Эстеразам приписывается важная регуляторная роль в ключевых физиологических процессах у насекомых: они участвуют в метаболизме липидов и в гидролизе других эндогенных соединений, относящихся к классу эфиров карбоновых кислот (Lands, 1965), в процессах вителлогенеза и репродукции (Hooper, Wan, 1966; Bonning e. a., 1997). Установлена причастность карбоксилэстераз гемолимфы, так называемых «ЮГ-эстераз», к регуляции титра ювенильного гормона (Hammock, 1985; Hoffmann e. a., 1994; Vermunt e. a., 1997; Woodring, Hoffmann, 1997; Paterson, Weaver, 1997). Показано, что уровень активности эстераз у насекомых коррелирует с устойчивостью к инсектицидам (Oppendorth, 1985), что, вероятно, отражает их участие в защитно-приспособительных реакциях, предотвращающих отравление организма (Ishaaya, 1993). Исследование активности эстераз при микроспориidioзе представляет интерес по двум причинам. Во-первых, эстеразы принимают непосредственное участие в гидролизе триацилглицеролов — резервных липидов жирового тела насекомых. Воздействие микроспоридий — анаэробов, не обладающих митохондриями и находящихся в значительной энергетической зависимости от хозяина, на липидный обмен клетки хозяина до конца не ясно (Долгих, 1998), и любая новая информация по этому вопросу представляет интерес. Тем более интересно сравнительное изучение воздействия микроспоридий и аделеидных кокцидий (типичных аэробов!) — двух внутриклеточных паразитов, развивающихся в жировом теле у одного и того же хозяина, но вызывающих различные типы патогенеза (Долгих и др., 1996; Паскерова и др., 1998), на липидный обмен хозяина. Во-вторых, известно, что КЭ гемолимфы и жирового тела принимают участие в регуляции титра ювенильного гормона (ЮГП), гидролизуя его по сложной эфирной связи (Khlebodarova e. a., 1996), а воздействие микроспори-

дий на организм хозяина многими авторами сравнивалось с действием ЮГ или его аналогов, в связи с чем даже высказывалось предположение о возможности синтеза ЮГ микроспоридиями (Fischer, Sonborn, 1962). Во всяком случае, многими авторами убедительно показано, что микроспоридиоз оказывает сильнейшее воздействие на репродуктивную функцию и вызывает дестабилизацию гормонального баланса насекомых-хозяев (Исси, 1986).

Настоящее исследование посвящено изучению активности комплекса КЭ в жировом теле — месте обитания паразитов и в гемолимфе, где предположительно и осуществляется разложение ЮГ, и представляет собой попытку выяснить характер изменений активности эстераз в патогенезе микроспоридиоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Исследования проводились на лабораторной культуре сверчков *Gryllus bimaculatus*, содержащихся в стандартных условиях (Князев, 1985). Сверчков *Gryllus bimaculatus* заражали микроспоридиями путем внесения суспензии спор (10^6) в поилку, как было описано ранее (Dolgikh e. a., 1997). Для изучения воздействия кокцидий *Adelina grylli* использовали спонтанно зараженных особей, которые постоянно присутствуют в экспериментальной культуре. Заражение контролировали прижизненным микроскопированием участков жирового тела с помощью фазово-контрастной оптики.

Цитохимическое выявление эстераз в гемоцитах проводили в соответствии с методикой, описанной ранее (Глупов и др., 1997) для анализа гемоцитов *Galleria mellonella* с помощью ферментных маркеров, модифицированной для нашего объекта. Гемолимфу собирали от каждого сверчка индивидуально путем прокола покровов между головной капсулой и тергитом переднегруди. Для получения гемоцитов гемолимфу (20—50 мкл) собирали в эппендорфы, содержащие равное количество антикоагулянта. Гемолимфу центрифугировали при 500—1000 g 5 мин. Супернатант использовали для спектрофотометрического и электрофоретического анализов. Осадок, содержащий гемоциты, дважды промывали в антикоагулянте, а перед использованием — в 0.1 М фосфатном буфере (ФБ). Суспензию гемоцитов наслаивали на предметное стекло и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре 15 мин. Адгезировавшие к стеклу гемоциты фиксировали в формалин-глутаровом фиксаторе (1.5 % параформальдегида, 0.25 % глутаральдегида, 0.1 М ФБ). После фиксации монослой инкубировали 30 мин в растворе, содержащем 0.5 мг/л α -нафтилацетата и 0.5 мг/л прочного синего RR в 0.1 М ФБ. Стекла с окрашенными монослоями гемоцитов (рис. 1) изучали в световом микроскопе: подсчитывали долю окрашенных гемоцитов от общего числа клеток в поле зрения микроскопа. Статистическую обработку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

Активность эстераз определяли в жировом теле и в плазме гемолимфы взрослых самцов и самок на 3—5-й дни после линьки на имаго или у личинок последнего (6-го) возраста. Сравнивались четыре варианта (в 3—4 повторностях): а) незараженное жировое тело (контроль); б) жировое тело, содержащее гамонты, спорулированные и неспорулированные ооцисты кокцидий *Adelina grylli* (кокцидиоз); в) жировое тело, содержащее преимущественно меронты и споронты микроспоридии *Nosema grylli* (микроспоридиоз, стадии); г) жировое тело, содержащее преимущественно споры микроспоридий (микроспоридиоз, споры). Пробы жирового тела гомогенизировали, а пробы гемолимфы в антикоагулянте смешивали с равным объемом 40 %-ной сахарозы и 1 %-ного тритона X-100. Эстеразы разделяли в полиакриламидном геле (концентрация акриламида в разделяющем геле 7.5 %, тритона X-100 — 0.2 %) с использованием трис-вероналового буфера (pH 7). По окончании электрофореза гели инкубировали в растворе, содержащем 0.56 %-ный α -нафтилацетат (или ацетилтиохолиниодид для выявления ацетилхолинэстеразы) в 0.2 М фосфатном буфере (ФБ) (pH 7.0), 2 %-ный ацетон и 0.2 %-ную диазосоль прочного синего RR (Sula, Weida, 1983).

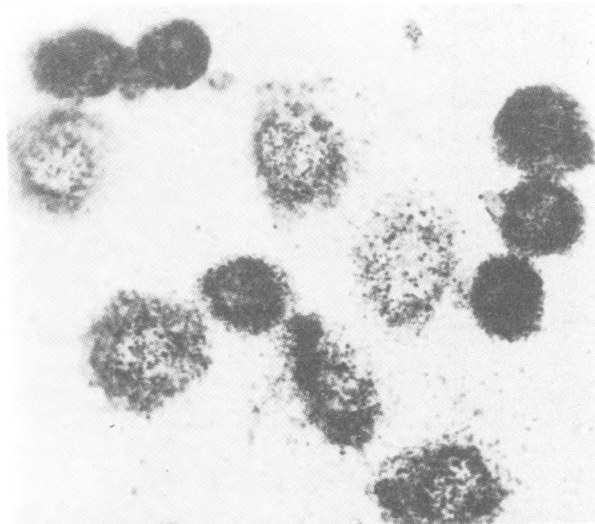


Рис. 1. Гистохимическое выявление эстеразной активности в монослое гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus*.

Fig. 1. Histochemical localization of the esterase activity (reaction with α -naphthylacetate) in haemocyte monolayer of the cricket *Gryllus bimaculatus*.

Спектрофотометрическое определение активности эстераз проводили по Асперену (Asperen, 1962) в гемолимфе контрольных и зараженных микроспоридиями сверчков, освобожденной от гемоцитов путем центрифугирования. В качестве субстрата использовали 0.03 М раствор α -нафтилацетата (предварительно растворенного в ацетоне) в 0.04 М ФБ. Активность фермента регистрировали с помощью цветной реакции образующихся нафтолов с диазосолью прочного синего RR. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 600 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитохимическое выявление неспецифических эстераз в монослоях гемоцитов. Реакция выявлялась в виде темно-коричневых точек, диффузно распределенных по всей цитоплазме гемоцитов и присутствующих в той или иной степени во всех форменных элементах. Однако интенсивность окрашивания существенно различалась. Так, веретеновидные гемоциты и мелкие округлые клетки, идентифицируемые нами как прогемоциты, практически не окрашивались — в клетках присутствовало лишь незначительное число гранул продукта реакции. Небольшая группа клеток была окрашена слабо, в них хорошо различалось ядро, а гранулы распределялись диффузно, и, наконец, третья группа клеток была интенсивно окрашена в коричневый цвет, границы гранул и ядро клетки были неразличимы (рис. 1). Клетки последней группы мы рассматривали как обладающие положительной реакцией на эстеразы. В норме доля положительно окрашенных гемоцитов от общего числа клеток в поле зрения микроскопа варьировала от 0 до 80 %, однако наиболее часто встречающиеся значения (медианы выборок) лежали в области 40—60 %. Значения долей гемоцитов с положительной реакцией у насекомых, зараженных кокцидиями, находились в этом же диапазоне и соответствовали максимальным контрольным значениям. При микроспоридиозе, напротив, количество клеток с положительной реакцией было в большинстве случаев достоверно ниже, чем в других вариантах; наиболее часто доля положительно окрашенных гемоцитов в поле зрения микроскопа не превышала 10—20 % (рис. 2).

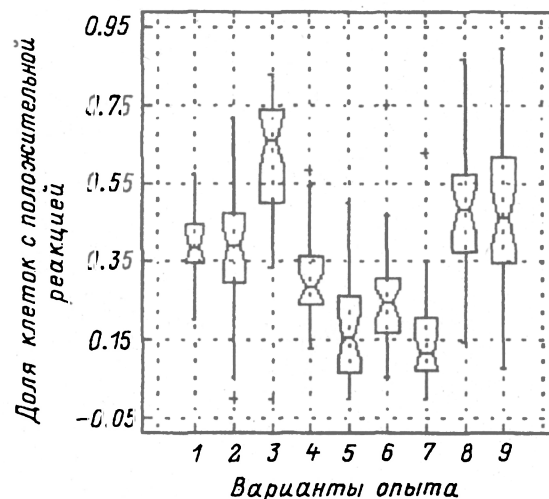


Рис. 2. Активность неспецифических карбоксилэстераз, выявленная цитохимически в монослоях гемоцитов сверчков *Gryllus bimaculatus*.

По оси ординат: доля клеток с положительной реакцией; по оси абсцисс: 1—3 — контроль, 4—7 — заражение микроспоридией *Nosema grylli*, 8, 9 — заражение кокцидией *Adelina grylli*. Результаты статистической обработки представлены в виде квантильной диаграммы. Медиана выборки дана с 95 %-ным доверительным интервалом. Границы боксов определяются нижним (25 %) и верхним (75 %) квантилем; границы вертикальных линий — нижним (10 %) и верхним (90 %) децилем. Выборочные значения, лежащие вне этого интервала, обозначены «+» (по результатам однофакторного дисперсионного анализа).

Fig. 2. Unspecific carboxylesterase activities, revealed cytochemically in the haemocytes' monolayers from the crickets *Gryllus bimaculatus*.

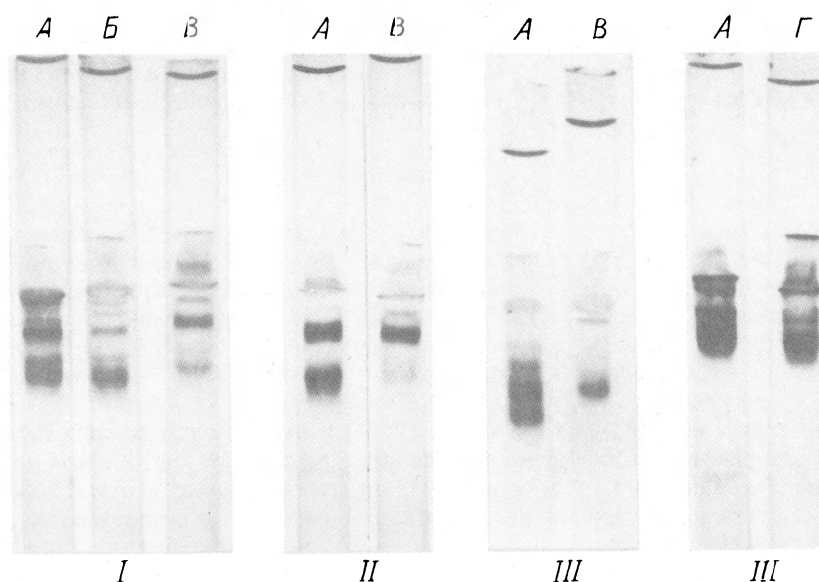


Рис. 3. Фракционный состав эстераз в гемолимфе сверчка в норме и при заражении микроспоридиями и кокцидиями.

A — контроль (отсутствие заражения); B — заражение микроспоридиями (стадии меро- и спорогонии); B — заражение микроспоридиями (споры); Г — заражение кокцидиями; I — имаго самцы; II — имаго самки; III — личинки последнего возраста, самцы.

Fig. 3. Carboxylesterase fractions in the haemolymph of the crickets, infected with a microsporidian *Nosema grylli* and a coccidian *Adelina grylli*.

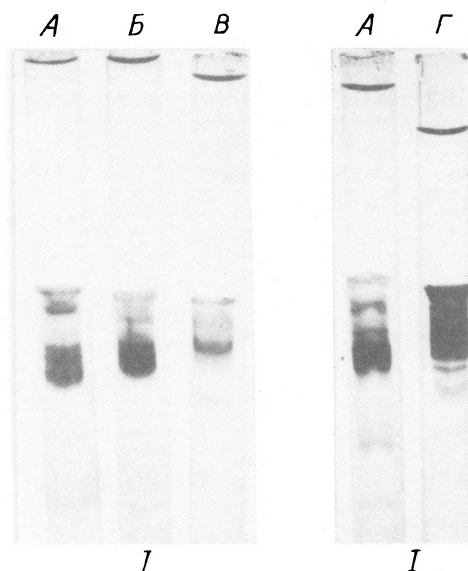


Рис. 4. Фракционный состав эстераз в жировом теле сверчка в норме и при заражении микроспоридиями и кокцидиями.

Обозначения такие же, как на рис. 3.

Fig. 4. Carboxylesterase fractions in the fat body of the crickets, infected with a microsporidian *Nosema grylli* and a coccidian *Adelina grylli*.

Выявление множественных форм неспецифических эстераз в жировом теле и гемолимфе контрольных и зараженных сверчков. В образцах гемолимфы и жирового тела были выявлены 3—5 множественных молекулярных форм неспецифических эстераз (рис. 3, 4) и фракции холинэстеразы со слабой активностью (не показано). Сравнение спектров множественных молекулярных форм эстераз у самок, самцов и личинок контрольных сверчков показало, что их активность у сопоставляемых групп сильно варьирует. В этой связи все дальнейшие опыты проведены на сверчках на 3—5-й дни после линьки на имаго либо на личинках последнего возраста. Активность эстераз в жировом теле самок в большей степени подвержена колебаниям, чем у самцов. Фракционный состав существенно не отличается у самцов и самок. У личинок обоих полов наблюдали более низкую активность некоторых множественных молекулярных форм эстераз по сравнению со взрослыми особями. Сравнение активности множественных форм неспецифических эстераз гемолимфы выявило следующее. При микроспоридиозе с преобладанием внутриклеточных стадий интенсивность реакции не изменялась по сравнению с контролем (рис. 3, А, Б). Если же жировое тело было заполнено спорами микроспоридий, то в гемолимфе наблюдалось общее снижение активности и уменьшение числа выявляемых эстеразных фракций (рис. 3, А, В). При кокцидиозе активность всех форм эстераз либо не изменялась, либо незначительно увеличивалась (рис. 3, А, Г). В жировом теле распределение активности неспецифических форм эстераз по вариантам подчинялось такой же закономерности (рис. 4). Результаты опытов показывают, что при заражении микроспоридиями наблюдается тенденция к снижению активности карбоксилэстераз как в гемолимфе, так и в жировом теле сверчков.

Спектрофотометрический анализ плазмы гемолимфы также показал достоверное снижение удельной активности неспецифических эстераз у зараженных насекомых обоих полов при активном спорообразовании микроспоридий (см. таблицу). Характерно, что у сверчков, в которых выявляли в основном внутриклеточные стадии развития паразита, а не споры и внешние симптомы заражения не были заметны,

Удельная активность общих эстераз в гемолимфе
сверчков *Gryllus bimaculatus*
Specific activities of general esterases in the haemolymph
of the cricket *Gryllus bimaculatus*

Вариант	A ₆₀₀ /мг белка	X ± SE
M1	7.826	20.72 ± 8.915
	16.521	
	37.826	
K1	80	80.435 ± 2.145
	80.348	
	76.957	
M2	42.647	46.08 ± 5.295
	56.471	
	39.118	
K2	94.118	99.61 ± 3.419
	105.882	
	98.824	

Примечание. Абсорбция (оптическая плотность) при длине волны 600 нм (A₆₀₀) измерялась через 30' после добавления α-нафтилацетата при температуре 20°. К — контроль; М — сверчки, зараженные микроспоридиями; 1 — самцы; 2 — самки.

значения удельной активности эстераз, выраженные в единицах оптической плотности на мг белка, были достоверно выше, чем при спорообразовании, и ниже, чем у контрольных особей. Они составили 37.83 A₆₀₀/ мг белка для самцов и 72.65 A₆₀₀/мг белка для самок.

ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение активности эстераз при микроспоридиозе имеет место как в инвазированных тканях — в кишечнике (Кольчевская, Кольчевский, 1988) и в жировом теле (настоящая работа), так и в свободных от паразитов тканях больных микроспоридиозом насекомых — в нервной цепочке (Ефименко, 1989) и в гемолимфе (настоящая работа). Падение активности может являться следствием неспецифического снижения общего метаболизма на фиксируемых (поздних) стадиях заболевания. Однако против этого предположения говорит тот факт, что различные ферментные комплексы по-разному реагируют на заражение: активность одних ферментов достоверно увеличивается, других — снижается, а третьих — остается без изменения по сравнению с контролем (Долгих и др., 1996; Долгих, 1998). Возможно также, что микроспоридии специфически ингибируют активность эстераз, например индуцируя какой-то неизученный фактор. Известно, что некоторые энтомопатогенные бактерии и нематоды вызывают снижение активности гидролитических ферментов — эстераз, фосфатаз, протеаз и др., что объясняется выделением этими патогенами токсинов, которые неспецифически подавляют активность ферментов, участвующих в защите насекомых от инфекций (Глулов, Бахвалов, 1998). Из гемолимфы гусениц *Pseudolitia separata* выделен и очищен низкомолекулярный пептид (4500 Да, 23 аминокислотных остатка), появляющийся при заражении *Apantheles kariyai*, который специфически ингибирует активность эстераз ювенильного гормона (Наyahava, 1990). При микроспоридиозах у насекомых также зафиксировано снижение активности кислой фосфатазы (Sokolova, Issi, 1990). Кроме того (при всей неоднозначности возможной интерпретации), ультраструктурный анализ зараженных тканей свидетельствует о высокой секреторной активности дорпорных

внутриклеточных стадий развития микроспоридий: в зоне меронтов и споронтов наблюдается обилие мелких пузырьков, часто связанных с плазмалеммой паразита, как бы «отпочковывающихся» от нее (Соколова и др., 1994).

КЭ играют исключительную роль во внутриклеточном метаболизме: взаимодействуя с фосфолипидами, они принимают активное участие в функционировании клеточных мембран и регуляции их проницаемости. При этом КЭ из разных клеточных компартментов (из митохондриальной, микросомной или лизосомальной фракций) отличаются по своим свойствам и функциям (Брокерхоф, Дженсен, 1978). На организменном уровне снижение активности неспецифических эстераз может приводить к дисфункции множества регулируемых этими ферментами процессов. В частности, показано, что эстеразы играют важную роль в вителлогенезе (Hooreg, Wan, 1966), а также в лизисе желточных клеток и активно развивающихся яиц у *Bombux mori* (Kai, Hasegawa, 1973). Возможно, именно ингибирование эстеразной активности является одной из причин наблюдаемого при микроспоридиозе нарушения транспорта вителлогенинов, накапливающихся в гемолимфе (Селезнев и др., 1997), а также недоразвития гонад у самок сверчков *Gryllus bimaculatus* (Долгих и др., 1996).

Активность комплекса карбоксилэстераз, выявляемая в жировом теле, вероятно, связана с регуляцией липидного обмена хозяина. Так, увеличение активности эстераз при кокцидиозе может свидетельствовать о мобилизации триацилглицеридов в связи с возросшими энергетическими потребностями организма хозяина, что подтверждается данными о быстром исчезновении липидов из жирового тела (Паскорова и др., 1998). При микроспоридиозе нарушения липидного обмена носят, по-видимому, принципиально иной характер: во-первых, липидные капли не исчезают из цитоплазмы зараженных клеток так быстро, как при кокцидиозе, а во-вторых, наблюдается заметная гипертрофия зараженного органа, которая сменяется резким его истощением только на самых последних этапах заболевания.

При изучении патогенеза микроспоридиозов насекомых наиболее пристального внимания заслуживает, на наш взгляд, изучение эстераз в связи с их ролью регуляторов титра ювенильного гормона (ЮГ) (Hammock, 1985), так как именно «ювенилизация» зараженных особей является характерным признаком микроспоридиозов насекомых. У насекомых с полным и неполным превращением при заражении микроспоридиями наблюдается растягивание личиночных возрастов, увеличение числа линек, нарушения метаморфоза и морфогенеза отдельных органов. Мы предполагаем, что снижение активности эстераз гемолимфы, участвующих в деградации ЮГ, может приводить к накоплению гормона и к эффекту ювенилизации, регулярно наблюдаемому при микроспоридиозе. У нескольких видов насекомых, в том числе и у сверчков, уже выявлены и охарактеризованы специфические эстеразы ювенильного гормона (ЮГ-эстеразы), изучена их динамика в ходе жизненного цикла хозяина (Hoffmann e. a., 1994; Vermunt e. a., 1997; Woodring, Hoffmann, 1997; Patterson, Weaver, 1997; Stauffer e. a., 1997). Показано, что фермент ингибируется специфическим ингибитором OTFP (3-Octylthio—1,1,1,-fluoropropan—2,1), который, по крайней мере частично, синтезируется в сопрога cordiaca и выделяется в гемолимфу. ЮГ-эстераза действует как антагонист ЮГ. На *Manduca sexta* показано, что из гемолимфы ЮГ эстераза элиминируется перикардиальными клетками с помощью опосредованного рецепторами эндоцитоза и подвергается деградации в лизосомах. С помощью вестерн-гибридизации показано, что в перикардиальных клетках ЮГ-эстераза связывается с белками теплового шока (HSP), предположительно участвующими в «сортировке» белков, предназначенных для попадания в лизосомы (Bonning e. a., 1997). Характерно, что микроспоридиоз вызывает заметное увеличение количества HSP70 в зараженных тканях двупятнистого сверчка (Селезнев и др., 1994). Выявление специфических ЮГ-эстераз из комплекса неспецифических эстераз и изучение воздействия на них микроспоридий — следующий этап исследования патогенеза микроспоридиозов насекомых.

Работа поддержана РФФИ: 97-04-48383, 96-04-48985 и ФЦП Интеграция К—0955.

Список литературы

- Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. Москва: Мир, 1978. 396 с.
- Глупов В. В., Бахвалов С. А. Механизмы резистентности насекомых при патогенезе // Усп. совр. биол. 1998. Т. 21. С. 57—71.
- Глупов В. В., Хвощевская М. Ф., Щепеткин И. А., Крюкова Н. А. Морфофункциональная структура популяции гемоцитов *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при инфекционном процессе // Изв. Академии наук. Сер. «Биология». 1997. Т. 6. С. 1236—1245.
- Долгих В. В. Сравнительное изучение активностей четырех ферментов гликолиза в жировом теле сверчка *Gryllus bimaculatus* при паразитировании микроспоридии *Nosema grylli* и кокцидии *Adelina grylli* // Паразитология. 1998. Т. 32, вып. 5. С. 464—467.
- Долгих В. В., Григорьев М. В., Соколова Ю. Я., Исси И. В. Сравнительное изучение влияния микроспоридии *Nosema grylli* и кокцидии *Adelina* sp. на развитие яичников и активность трех дегидрогеназ в жировом теле самок сверчков *Gryllus bimaculatus* // Паразитология. 1996. Т. 30, вып. 1. С. 70—75.
- Ефименко Т. М. Биологическое обоснование применения микроспоридий самостоятельно и совместно с бактериальными препаратами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: ВИЗР, 1989. 23 с.
- Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Микроспоридии. Л.: Наука, 1986. С. 6—136.
- Князев А. И. Цикл развития сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания // Энтомол. обозр. 1985. Т. 64, вып. 1. С. 58—73.
- Кольчевская Е. Н., Кольчевский А. Г. Анализ множественных форм неспецифических эстераз гусениц капустной совки, зараженных микроспоридиями *Vairimorpha anthracae* // Бюл. ВИЗР. 1988. С. 18—21.
- Паскорова Г. Г., Соколова Ю. Я., Добровольский А. А. Особенности патогенеза жирового тела сверчка *Gryllus bimaculatus* при кокцидиозе, вызванном аделидной кокцидией *Adelina grylli* // Паразитология. 1998. Т. 32, вып. 5. С. 457—463.
- Селезнев К. В., Долгих В. В., Маргулис Б. Н. Некоторые особенности изменения белкового состава жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus* при заражении микроспоридией *Nosema grylli* sp. n. // Актуальные вопросы медицинской паразитологии. СПб.: ВМА, 1994. С. 50.
- Селезнев К. В., Антонова О. А., Исси И. В. Влияние микроспоридиоза на состав белков в жировом теле и гемолимфе сверчков *Gryllus bimaculatus* // Паразитология. 1997. Т. 31, вып. 2. С. 181—185.
- 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.
- Asperen H., van A. A study of housefly esterases by means of sensitive colorimetric method // J. Insect Physiol. 1962. Vol. 8, N 4. P. 401—406.
- Bonning B. C., Booth T. F., Hammock B. D. Mechanistic studies of the degradation of juvenile hormone esterase in *Manduca sexta* // Archives of Insect Biochem. and Physiol. 1997. Vol. 34, N 3. P. 275—286.
- Choudhury S. R. The nature of nonspecific esterases. A subunit concept // J. Histochem. Cytochem. 1972. Vol. 20, N 7. P. 507—517.
- Dolgikh V., Sokolova J., Issi I. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian *Nosema grylli* // J. Euk. Microbiol. 1997. Vol. 44. P. 246—249.
- Fischer F. M., Sonborn R. C. Production of insect juvenile hormone by the microsporidian parasite *Nosema* // Nature. 1962. Vol. 4834, N 194. P. 1193.
- Hammock B. D. Regulation of juvenile hormone titer: degradation // Compr. Insect. Physiol. and Pharmacol. (Eds Kerkut G. A., Gilbert L. J.). 1985. Vol. 7. P. 431—472.
- Hayahawa Y. Juvenile hormone esterase activity repressive factor in the plasma of parasitized insected larvae // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265, N 19. P. 10813—10816.
- Hoffmann K. H., Fibinger S. C., Hoffmann G. Haemolymph juvenile hormone III esterase activity during adult life of female and male crickets *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae) // Comp. Biochem. and Physiol. 1994. Vol. 109, N 2. P. 285—291.
- Hooper G. H. S., Wan T. K. Aliesterase activity and reproduction in *Blattella germanica* // Entomol. Exptl. et Appl. 1966. N 2. P. 211—220.
- Ishaaya I. Insect detoxifying enzymes: their importance in Pesticide synergism and resistance // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 1993. Vol. 22. P. 263—276.

- Kai H., Hasegawa K. An esterase in relation to yolk cell lysis at diapause termination in the silkworm, *Bombix mori* // *J. Insect Physiol.* 1973. Vol. 19, N 4. P. 799—810.
- Khlebodarova T. M., Gruntenko N. E., Grenback L. G., Sukhanova M. Z., Mazurov M. M., Raushenback I. Y. A comparative analysis of juvenile hormone metabolizing enzymes in two species of *Drosophila* during development // *Insect Biochem. and Mol. Biol.* 1996. Vol. 26, N 8—9. P. 829—835.
- Lands W. E. M. Lipid metabolism // *An. Rev. Biochem.* 1965. Vol. 34. P. 313—339.
- Oppenoorth E. J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance // *Compreh. Insect. Physiol. Biochem. a. Pharmac.* 1985. Vol. 12. P. 731—773.
- Paterson Z. A., Weaver R. J. Characterization and temporal aspects of haemolymph juvenile hormone esterase in adult cockroach, *Periplaneta americana* // *J. Insect. Physiol.* 1997. Vol. 43, N 6. P. 521—532.
- Sokolova Ju. Ja., Issi I. V. Ultrastructure and functional activity of mitochondria and lysosom system from insect cells after microsporidian invasion // *Bull. Soc. Franc. Parasitol.* 1990. Vol. 8. Suppl. 1. P. 203.
- Stauffer C., Shiotsuki T., Chan W., Hammock B. D. Characterization of the esterase isozymes of *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1997. Vol. 34, N 2. P. 203—221.
- Sula J., Weida F. Esterase polymorphism in several populations of the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. // *Experientia.* 1983. Vol. 39. P. 78—79.
- Vermunt A. M. W., Vermeesch A. M. G., Decort C. A. D. Purification and characterization of juvenile hormone esterase from hemolymph of the Colorado Potato beetle // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1997. Vol. 35, N 3. P. 261—277.
- Woodring J., Hoffmann K. H. Apparent inhibition of in vitro juvenile hormone biosynthesis by the corpus cardiacum of adult crickets (*Gryllus bimaculatus* and *Achaeta domestica*) is due to juvenile hormone esterase // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1997. Vol. 34, N 1. P. 19—29.

ВИЗР, Пушкин — 8, 189620

Поступила 20.04.1999

SUPPRESSING OF ESTERASE ACTIVITIES AS A SPECIFIC FEATURE OF MICROSPORIDIOSIS IN CRICKETS *GRYLLUS BIMACULATUS*

Yu. Ya. Sokolova, O. V. Sundukov

Key words: microsporidiosis, *Nosema grylli*, *Adelina grylli*, esterase activity, *Gryllus bimaculatus*.

SUMMARY

The goal of the present work is to examine the effect produced by the microsporidian *Nosema grylli* (Microspora, Nosematidae) on carboxylesterases' complex in the fat body (the site of parasite location), and in the haemolymph of the *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae). The simultaneous study of the influence of another intracellular parasite of the cricket adipocytes — a coccidian *Adelina grylli* has been performed to compare the effect produced by two parasites.

Carboxylesterase (CEs) (EC 3.1.1.1.—3.1.1.5.) form a group of enzymes, hydrolyzing the ethers of carbonic acids. The identification of the separate enzymes inside the group is hardly possible due to their overlapping substrate and inhibitory specificity (Choudhury, 1972). CEs are believed to play an important regulatory role in the key physiological processes in insects: in lipid metabolism, vitellogenesis, reproduction and others (Lands, 1965; Hooper, Wan, 1966; Bonning e. a., 1997). CEs from insect haemolymph, so called JH esterase, participate in the degradation of juvenile hormone (JH) (Hammock, 1985; Hoffmann e. a., 1994; Vermunt e. a., 1997; Woodring, Hoffmann, 1997; Paterson, Weaver, 1997). CE activity correlates with the insect ability to detoxification (Oppendorth, 1985; Ishaaya, 1993). Investigation of CEs activities during the microsporidiosis is of interest mainly for the following reasons. 1) CEs actively participate in the hydrolysis of triacylglycerids — the main storage lipids in Insects. Thus, the study of the effect produced

by the anaerobic microsporidians (M) and aerobic coccidians on the activity of CEs in host tissues might be helpful in understanding the mechanisms of pathogenesis of each pathogen (Долгих и др., 1996; Паскерова и др., 1998). 2) Taking in account the role of CEs in JH III titer regulation (Khlebodarova e. a., 1996) and since it was shown that M influence on the host hormonal status similar to JH (Fischer, Sonborn, 1962; Issi, 1986), it was important to assess the influence of M on the enzyme activities.

Studies were performed on the laboratory culture of *Gryllus bimaculatus*. Crickets were infected perorally with the suspension of spores added to the drinking water as described elsewhere (Dolgikh e. a., 1997). Crickets spontaneously infected with *Adelina grylli*, were used in the experiments. Haemolymph (20—50 µl) individually taken, was collected in the tubes, containing anticoagulating solution (0.1 M NaOH, 0.15 M NaCl, 0.017 EDTA, 0.04 M citric acid), and was centrifuged 5 min at 500—1000 G. Supernatant was used for the spectrophotometry and electrophoresis. The sediment containing haemocytes, after washing in 0.1 M PBS, was put on slides and incubated 15—20 min at RT in moisture chambers. The adhered haemocytes were fixed in paraformaldehyde—glutaraldehyde mixture and incubated 30 min in the reactive solution (0.5 mg/l α -naphthylacetate and 0.5 mg/l blue RR stain (Reanal) in 0.1 PBS). Slides with stained monolayers of haemocytes were studied in the light microscope (fig. 1, 2). Activities of esterases, separated by gel-electrophoresis were studied in the fat body and haemolymph of the 3—5 days old males and females or of the last (6-th) instar larvae. Samples were mixed with the equal volume of 40 % sucrose and 1 % Triton X-100 in PBS. After electrophoresis gels were incubated in the solution, containing 0.56 % α -naphthylacetate in 0.2 M PBS (pH 7.0), 2 % acetone and 0.2 mg/l blue RR stain in 0.1 PBS (Sula, Weida, 1983). Spectrophotometrical study of esterase activities was performed in haemolymph deprived of haemocytes according Asperen (1962). Solution of 0.03 M α -naphthylacetate in 0.04 M PBS was used as a substrate. Enzyme activities was detected by the color reaction with blue RR stain. Optical density was measured with the help of spectrophotometer SP-46 at wavelength 600 nm.

The obtained results (fig. 1—4; table) point to the inhibition of the esterase activities in all studied tissues while microsporidiosis. Infection of the cricket with a coccidian *A. grylli* did not cause the fall in the enzyme activity, on the contrary it enhance activities of some of forms of the enzyme.

The CEs activities could decrease due to unspecific fall of general metabolism on the acute phase of the disease, though this assumption is in contradiction to the data obtained for other enzymes, which activities essentially increase while microsporidiosis (Долгих и др., 1996; Долгих, 1998). Microsporidians may secrete a factor suppressing host hydrolases, including those, participating in the insect defense reactions esterase activities, like some of entomopathogenic bacteria, nematodes and parasitic hymenopterans (Глунов, Бахвалов, 1998). A peptide, specifically inhibiting JH esterase activities, has been isolated from haemolymph of *Pseudolitia separata* larvae infected with *Apantheles kariyai* (Hayahava, 1990). Our previous cytochemical studies showed that microsporidiosis caused the suppressing of acid phosphatase activity (Sokolova, Issi, 1990). Besides, EM analysis revealed numerous vesicles associated with a parasite's plasmalemma suggesting high secretory activity of the microsporidian prespore stages (Соколова и др., 1994). Activities of fat body CEs have to play an essential role in a regulation of the lipid metabolism. An increase of the enzyme activity after the infection with *Adelina grylli* is presumably connected with a rapid utilization of triacylglycerids in the course of infection (Паскерова и др., 1998). The observed «juvenilization» of the microsporidian infected insects indicating putative enhancement of JH titer, might be considered as a consequence of the fall of the JH esterase activity. Isolation of the specific JH esterases and analysis of the alterations in their activities due to infection with the pathogens is the next step of the research. Supported by RFBR: 97-04-48383, 96-04-48985 and «Integracia» K—0955.