

УДК 576.892.195:595.729+591.85

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕМОЦИТОВ СВЕРЧКА
GRYLLUS BIMACULATUS (ORTHOPTERA: GRYLLIDAE)
В НОРМЕ И ПРИ ОСТРОМ МИКРОСПОРИДИОЗЕ,
ВЫЗЫВАЕМОМ NOSEMA GRYLLI**

© Ю. Я. Соколова, Ю. С. Токарев, Я. Л. Лозинская, В. В. Глупов

Изучена структура популяции гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus*. Описана тонкая морфология основных типов гемоцитов, характерных для прямокрылых: прогемоцитов, гранулоцитов и плазматоцитов, а также сферулоцитов и коагулоцитов, участвующих в защитных реакциях и выявленных при инвазии сверчка кокцидией *Adelina grylli*. Впервые изучено влияние микроспоридиоза, вызываемого *Nosema grylli*, на морфофункциональный состав популяции гемоцитов сверчка. При поступлении спор микроспоридий в гемолимфу в острой фазе микроспоридиоза повышается относительная доля гранулоцитов и снижается доля плазматоцитов сверчка. Гемоциты формируют цитоплазматические выросты, слипаются между собой, образуют клампы. Часть спор адгезирует к поверхности гемоцитов и фагоцитируется. В лимфе появляются гигантские клетки, заполненные спорами и напоминающие одноклеточные ксеномы или тератоциты. При использовании ферментных маркеров показано резкое снижение относительной доли фенолоксидазоположительных и эстеразоположительных клеток гемолимфы сверчков при остром микроспоридиозе. Предполагается угнетение микроспоридиями защитных систем насекомых-хозяев. Доля гемоцитов, дающих реакцию «кислородного взрыва», существенно не изменяется при микроспоридиозе.

Гемоциты насекомых — гетерогенная популяция клеток мезодермального происхождения. Они участвуют в многочисленных процессах, связанных с жизнедеятельностью насекомых: в метаморфозе, в синтезе ряда ферментов, в регенерационных и защитных процессах. Важнейшая роль гемоцитов — формирование защитной реакции организма в ответ на внедрение чужеродных объектов органической и неорганической природы (Ratcliffe, 1985; Lackie, 1988). У насекомых отсутствует система синтеза и накопления антител — иммуноглобулинов, вырабатываемых в ответ на конкретный антиген (то, что понимается под специфическим иммунитетом высших животных); в то же время у них имеется достаточно широкий арсенал средств неспецифической защиты, включающий реакции клеточной и гуморальной систем. Гемоциты осуществляют фагоцитоз, инкапсуляцию и образование меланиновых гранул вокруг чужеродных частиц. Они же секретируют в плазму гемолимфы большинство факторов гуморального иммунитета (Gupta, 1985; Götz, Voman, 1985; Глупов, 1996). Вполне закономерно, что при остро текущих болезнях (бактериозах, вирусозах, микозах и др.) и заражении насекомыми-энтомофагами регистрируются значительные изменения в морфологии и качественном составе гемоцитов (Андреева, 1974; Козлов и др., 1988; Weiser, 1969; Vinson, 1990).

Для большинства облигатных паразитов характерны две основные эволюционные тенденции, позволяющие поддерживать паразито-хозяинные системы в состоянии динамического равновесия: 1) выработка эффективных механизмов преодоления защитных реакций хозяина и 2) сохранение относительно низкого уровня патогенности, обеспечивающего достаточный для функционирования паразита жизненный потенциал хозяина (Götz, Voman, 1985). Оба направления эволюции приводят к снижению антагонизма парази-

то-хозяйинных взаимоотношений, который порой проявляется только на популяционном уровне (Шульман, Добровольский, 1977). Изучение защитных реакций хозяина дает важную информацию как для анализа характера и динамики отношений в системе паразит—хозяин, так и для выявления механизмов иммунного ответа. В большинстве случаев защитные реакции насекомых изучались в паразито-хозяйинных системах, где паразитами выступали прокариоты (Ratcliffe, Walters, 1983; Ratcliffe e. a., 1984; Leonard e. a., 1985, и др.), перепончатокрылые и нематоды (Götz, Boman, 1985; Vinson, 1990). Данные об участии гемоцитов в защитных реакциях организма при протозоозах единичны, фрагментарны и касаются в основном аделеиновых кокцидий и трипаносом (Weiser, Beard, 1959; Каауа e. a., 1986; Nigam e. a., 1997; Sokolova e. a., 1999). Микроспоридии в этом отношении представляют особый интерес по ряду причин.

1) Микроспоридии (М) — обширная группа облигатных паразитических протистов с широким спектром хозяев, включающим большинство типов животных от простейших до приматов. Особенности клеточной организации и молекулярной биологии М говорят о древнем происхождении группы. Длительность эволюции М как паразитов привела к выработке уникальных и совершенных приспособлений М к внутриклеточному паразитизму.

2) Для всех микроспоридий характерна внутриклеточная локализация, которая позволяет избежать действия защитных механизмов гемолимфы на начальных этапах заражения. Контакт с гемолимфой происходит при разрушении зараженных клеток и выпадении из них зрелых спор. Для некоторых видов М из насекомых показано участие гемоцитов в распространении инфекции по организму хозяина (David, Weiser, 1994). Фагоцитированные споры М предотвращают слияние лизосом с первичными фагосомами (David, Weiser, 1994); кроме того, *in vitro* показано подавление активности кислой фосфатазы и продукции супероксидов и оксида азота (II) в иммунокомпетентных клетках при фагоцитозе спор М из человека (род *Encephalitozoon*) в отличие от М из насекомых (*Vairimorpha plodiae*). Имеются также данные о подавлении фагоцитоза спор М *in vitro* (Ditrich e. a., 1997) и о способности М размножаться в гемоцитах насекомых (Козлов и др., 1988; Исси, лич. сообщ.). На организменном уровне показано подавление М *Nosema heliothidis* реакции инфильтрации зараженного жирового тела гемоцитами при развитии во взрослых особях специфического хозяина (Brooks, Cranford, 1978).

3) Для многих М, несмотря на высокоспецифичный облигатный паразитизм и длительность эволюции паразито-хозяйинных систем с их участием, характерна высокая патогенность по отношению к своим хозяевам, не свойственная паразитам-эукариотам, но наблюдаемая при паразитировании вирусов.

Все изложенное явилось причиной нашего интереса к изучению влияния микроспоридий на иммунный ответ насекомых-хозяев. Основная цель настоящей работы — изучение морфофункциональных изменений в популяции гемоцитов *Gryllus bimaculatus* и реализации клеточных защитных реакций насекомого-хозяина на поздних стадиях заражения *Nosema grylli* методами световой и электронной микроскопии и гистохимии. Особенно интересным представляется использование нижеперечисленных ферментных маркеров, которые ранее не использовались для исследований паразито-хозяйинных отношений М и насекомых.

Фенолоксидаза (ФО) (синонимы: полифенолоксидаза, тирозиназа) — маркер профенолоксидазной (проФО) системы, играющей существенную роль в устойчивости беспозвоночных к патогенам; ФО образуется из профенолоксидазы в результате серии ферментативных реакций так называемого «ФО каскада» (Ashida, Yamazaki, 1990), в том числе в ответ на заражение паразитами. В ряде экспериментов было показано участие фенолоксидаз в механизме распознавания «свой—чужой»; в фагоцитозе и в межклеточных взаимодействиях гемоцитов (Ratcliffe e. a., 1984; Leonard e. a., 1985); в меланизации и инкапсуляции чужеродных объектов (Götz, Boman, 1985).

Неспецифические карбоксилэстеразы — ферменты с широким спектром функций, связанных с катаболизмом эфиров жирных кислот, мобилизацией липидов, синтезом кутикулярных восков, контролем титра гормонов и др. (Брокерхоф, Дженсен,

1978). Защитные функции карбоксилэстераз связаны с детоксикацией пестицидов (Nouman, 1990; Серебров, 1998), а также с активацией фенолоксидазного каскада (Ashida, Yamazaki, 1990).

Группа ферментов, катализирующих синтез активированных кислородных метаболитов (АКМ), служит показателем «окислительного взрыва» — неспецифической защитной реакции, хорошо изученной у высших позвоночных (Меньшикова, Зенков, 1997; Laporte e. a., 1991). К настоящему времени у насекомых практически не изучены ни изменения генерации АКМ в гемоцитах, ни ферментативные системы, участвующие в образовании подобных соединений в клетках крови во время инфекционного процесса или при повреждении (Глулов, Бахвалов, 1998).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на лабораторной культуре сверчков, содержащейся в стандартных условиях (Князев, 1985). Сверчков II—III возрастов заражали *Nosema grylli* (лабораторная культура М из жирового тела сверчка) в течение недели путем внесения суспензии спор (10^6 — 10^8 спор/мл) в поилку (Dolgikh e. a., 1997). Контролем служили незараженные сверчки. В качестве второго (положительного) контроля и для выявления гемоцитов различных типов использовали насекомых, спонтанно зараженных аделеидной кокцидией *Adelina grylli*, также развивающейся в жировом теле. Инвазия *A. grylli* стимулирует весь комплекс защитных реакций сверчков: увеличение числа свободно циркулирующих гемоцитов, меланизацию пораженных участков жирового тела и инкапсуляцию паразитов (Паскерева и др., 1998).

Прижизненное наблюдение гемоцитов и контроль заражения осуществляли с помощью просмотра каплей гемолимфы в антикоагулянте (Söderhall, Smith, 1983) или мазков жирового тела в световом микроскопе OPTON, оснащенный фазово-контрастной оптикой.

Электронно-микроскопический анализ гемоцитов проводили рутинными методами (Соколова и др., 1994).

Цитохимическое выявление ферментов в гемоцитах проводили в соответствии с методикой, описанной ранее (Глулов и др., 1997) для анализа гемоцитов *Galleria mellonella* и незначительно модифицированной для нового 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 пластиковые пробирки (эппендорфы), содержащие равное количество антикоагулянта. Гемолимфу центрифугировали при 500—1000 g 5 мин. 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. Для выявления ФО активности адгезировавшие к стеклу гемоциты фиксировали 100 %ным уксусом, а для изучения эстераз — формалин-глутаровым фиксатором (1.5 % параформальдегида, 0.25 % глутаральдегида, 0.1 М ФБ) в течение 20 мин. После фиксации монослой инкубировали 30 мин в растворе, содержащем 4 мг/мл dl-дигидроксифенилаланина (ДОФА) для выявления ФО активности или в растворе, содержащем 0.5 мг/л смеси α - и β -нафтилацетата и 0.5 мг/мл прочного синего RR в 0.1 М ФБ для выявления эстеразной активности. Продукцию активных форм кислорода оценивали по восстановлению нитро-синего тетразолия (НСТ) до формаза, образующего плотный осадок. Стекла с монослоями гемоцитов инкубировали 1 ч при температуре 30° в ФБ с 1.7 мг/мл НСТ и 100 мкг/мл ЛПС. Затем клетки фиксировали 4 мин формалин-глутаровым фиксатором и промывали в дистиллированной воде. Стекла с окрашенными монослоями гемоцитов изучали в световом микроскопе: подсчитывали долю окрашенных гемоцитов от общего числа клеток в 30 полях зрения светового микроскопа для каждой повторности. Статистическую обработку проводили с помощью однофакторного дисперсионного и корреляционного анализов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При вскрытии сверчков нами отмечено, что жировое тело контрольных насекомых обычно чистое, полупрозрачное, часто с незначительным числом мелких очагов меланизации. Редко жировое тело имеет грязно-коричневый цвет. При инвазии микроспоридий в большинстве случаев жировое тело белое, немеланизированное, и только на поздних этапах заражения, когда жировое тело сверчка переполнено спорами, в нем могут наблюдаться очаги меланизации. Инвазия кокцидий приводит к интенсивной меланизации жирового тела, степень которой зависит от уровня заражения. Случаи, когда полостные стадии развития кокцидии изобилуют в чистом жировом теле сверчков, единичны.

Световая микроскопия

Прижизненное наблюдение гемолимфы здоровых сверчков (имаго обоих полов и личинок последнего возраста) в фазово-контрастный микроскоп выявило 3 основных типа клеток, по классификации Гупты (Gupta, 1985). Прогемоциты (Пр) — относительно мелкие (13—30 мкм) округлые клетки с крупными ядрами. Плазматоциты (Пл) — наиболее часто встречающиеся клетки овальной или веретенной формы. Эти клетки быстро распластаются по поверхности предметного стекла, в фазово-контрастном микроскопе имеют серый цвет. Они содержат многочисленные темные (поглощающие свет) и немногочисленные светлые (светопреломляющие) гранулы. Размеры веретенных Пл: 40—63 × 13—38 мкм. Встречаются и округлые Пл 30—35 мкм в диаметре. Последние отличаются от Пр наличием светлых гранул и несколько большим (по сравнению с Пр) ядерно-плазменным соотношением. Гранулоциты (Гр) у контрольных насекомых немногочисленны. Это округлые клетки 20—33 мкм в диаметре с большим количеством преломляющих свет гранул. Между клетками всех перечисленных выше групп имеются переходные формы как по размерным характеристикам, так и по количеству содержащихся в них гранул (рис. 1, А).

В острой фазе микроспориоза, характеризующейся массовой спорогонией и поступлением спор в гемолимфу, в первую очередь обращает на себя внимание увеличение числа округлых клеток, содержащих светопреломляющие гранулы, вероятно всего Гр (рис. 1, Б) и многочисленные группы гемоцитов, слипшихся между собой (клампы) (рис. 1, Б, В). Увеличивается количество светлых гранул и веретенных Пл (рис. 1, В). В целом доля веретенных клеток уменьшается по сравнению с контролем. Практически все клетки образуют цитоплазматические выросты (рис. 1, Б—Д). Споры, находящиеся в гемолимфе, прилипают к этим отросткам (рис. 1, В) и, вероятно, фагоцитируются плазматочитами, так как в поле зрения часто встречаются округлые клетки, содержащие споры (рис. 1, В, Г). Несколько реже на мазках гемолимфы встречаются округлые гемоциты 40—60 мкм в диаметре, набитые зрелыми спорами. Они окружены оболочкой 6—7 мкм толщиной и внешне напоминают ксеному (рис. 1, Д, Е), формируемую при заражении рыб микроспоридиями рода *Loma* (Lom, Pekarrinen, 1999).

Тонкая морфология гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus*

На ультраструктурном уровне различия между Пл и Пр не выявлены. В норме эти клетки имеют типичную ультраструктуру, описанную для других насекомых (Gupta, 1985). Некоторые Пл содержат электронноплотные гранулы, по-видимому, соответствующие «темным» светопоглощающим гранулам на световом уровне (рис. 2, А; см. вкл.). При инвазии сверчка кокцидией *A. grylli* Пл мигрируют в зараженные участки тела насекомого и инфильтруют пораженную ткань; при этом форма Пл меняется на амебонидную, а ядро принимает лопастевидную форму (рис. 2, Б). Гранулоциты, выявляемые в незараженных особях, имеют большей частью округлую форму и довольно

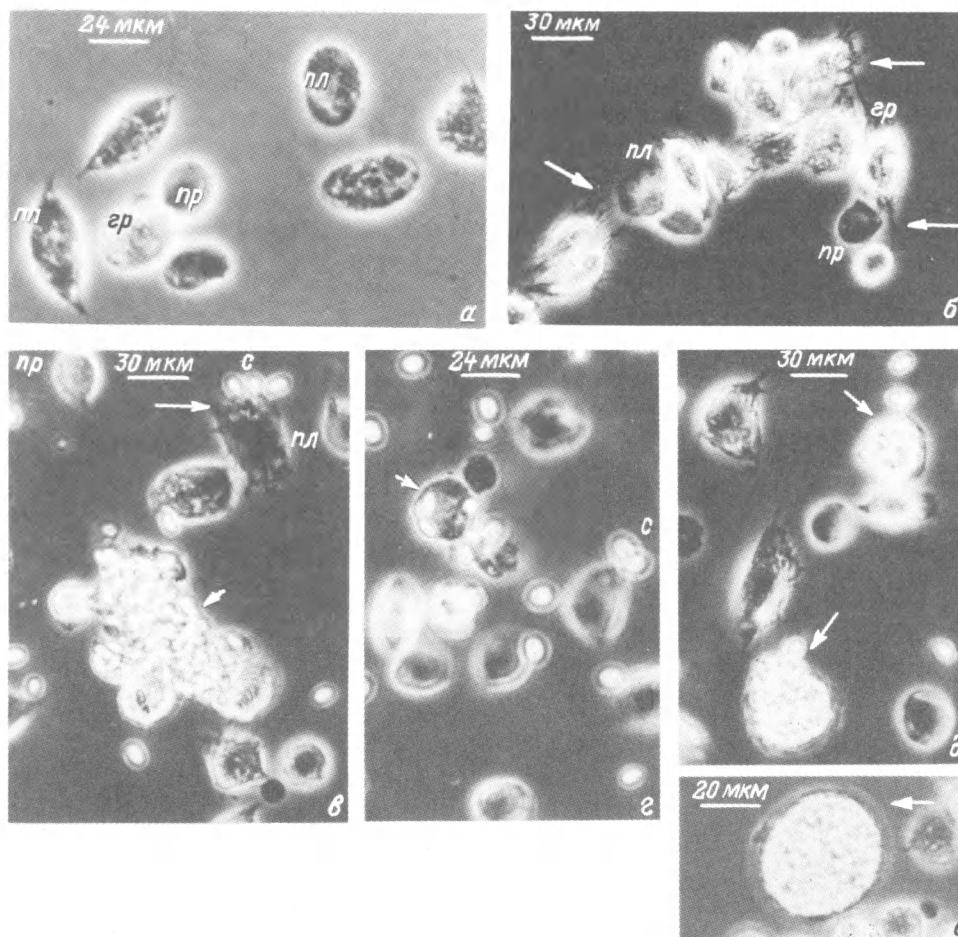


Рис. 1. Прижизненное наблюдение гемолимфы из здоровых и зараженных микроспоридией *Nosema grylli* сверчков *Gryllus bimaculatus* в фазово-контрастный микроскоп.

А — основные типы клеток гемолимфы здоровых сверчков; Б — образование сгустка (клампа) гемоцитов в гемолимфе больной микроспоридиозом личинки сверчка последнего возраста, стрелка — цитоплазматические выросты гемоцитов; В — гемоциты, заполненные спорами *Nosema grylli* (конец стрелки), образовали кламп, тонкая стрелка — цитоплазматические выросты; Г — гемоциты, содержащие споры (конец стрелки); Д — крупные клетки гемолимфы, заполненные спорами и окруженные плотными стенками, стрелки — разрывы плотных стенок; Е — интактная «циста», стрелка — ядро одной из клеток, участвующей в формировании оболочки «цисты»; гр — гранулоциты; пл — плазматочиты; пр — прогемоциты; с — споры *Nosema grylli*.

Fig. 1. The phase microscopy of unstained haemolymph from crickets *Gryllus bimaculatus* being healthy and infected with *Nosema grylli*.

крупное ядро. Их цитоплазма заполнена многочисленными электронноплотными гранулами, часто содержащими кристаллоподобные включения (рис. 2, В), по морфологии соответствующие «игловидным включениям», описанным для энцитоз чешуекрылых (Gurta, 1985). Вероятно, в процессе инкапсуляции эти клетки первыми соприкасаются с чужеродным субстратом и высвобождают содержимое гранул, инициируя меланизацию кора «узелка» (рис. 2, Г).

Ультраструктурный анализ зараженных кокцидиями особей выявил две специализированные формы гранулоцитов: коагулоциты (Ко) и сферулоциты (Сф), принимающие участие в иммунном ответе на заражение кокцидиями. Ко — клетки с рыхлой ма-

локонтрастной цитоплазмой, мелкими электронноплотными гранулами и крупным ядром. Они формируют внутренние слои многослойной оболочки «узелка» (рис. 2, *B, E*). Сф — крупные клетки с мелким, часто эксцентрично расположенным ядром. Вся цитоплазма Сф забита электронно-прозрачными гранулами. Сф встречаются вблизи «узелков» либо поодиночке, либо группами (рис. 2, *Д, E*). При первом электронно-микроскопическом анализе проб жирового тела сверчков, зараженных М, не наблюдалось скоплений гемоцитов вблизи пораженного органа. Однако при изучении очагов меланизации в жировом теле микроспориозных сверчков выявлены те же реакции образования «узелков» вокруг скоплений спор паразитов, что и при кокцидиозе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ МАРКЕРОВ

Активность фенолоксидазы (ФО) выявлялась в округлых клетках, по размеру и форме соответствующих гранулоцитам. Продукт реакции с ДОФА равномерно окрашивал клетки в темно-коричневый цвет, лишь по периферии оставляя зону, окрашенную слабее

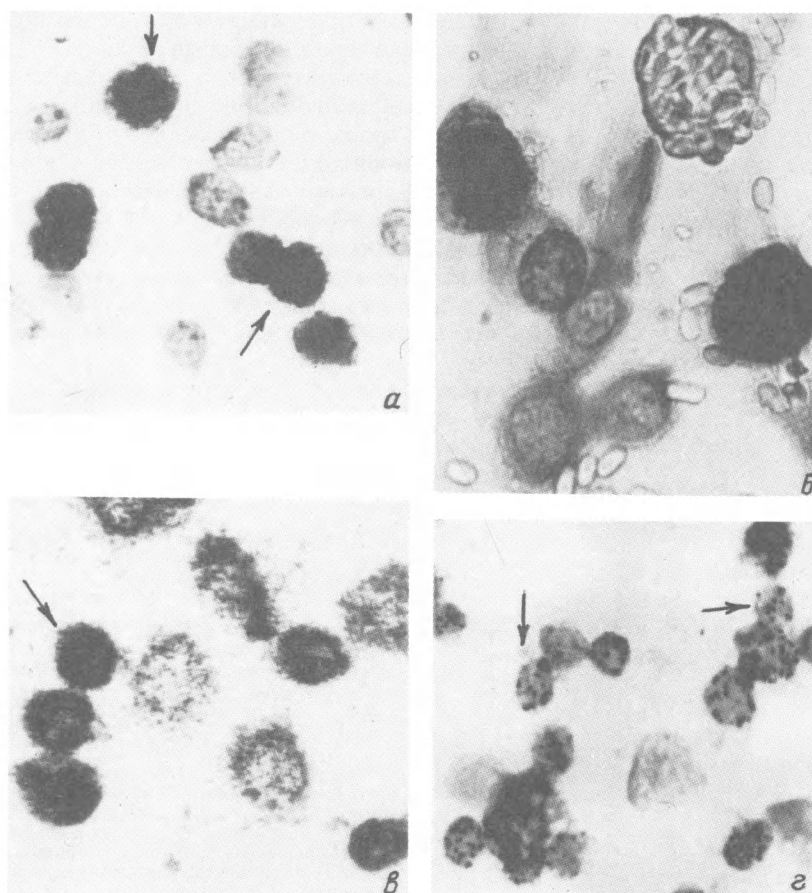


Рис. 3. Цитохимические реакции, выявляемые в монослоях гемоцитов, с помощью ферментных маркеров.

A — стрелка — плазматоциты, имеющие положительную фенолоксидазную реакцию (реакция с диоксифенилаланином); *B* — в гемоцитах, содержащих споры микроспоридий, фенолоксидазная активность не выражена; *B* — стрелка — гемоциты, имеющие положительную эстеразную реакцию (реакция с нафтилацетатом); *Г* — стрелка — гемоциты, в которых зафиксирована реакция кислородного взрыва (реакция с нитросиним тетразолием).

Fig. 3. Cytochemical reactions observed in haemocyte monolayers by means of enzyme markers.

(рис. 3, А). Продукт реакции не выявлялся в клетках, содержащих споры микроспоридий (рис. 3, Б). Подсчет гемоцитов, давших положительную реакцию, и статистическая обработка полученных данных методом квантильного анализа показали достоверное снижение доли положительных по ФО гемоцитов при микроспоридиозе по сравнению с обоими контролями (отрицательным — незараженные сверчки и положительным — заражение *A. grylli*). Несмотря на индивидуальный разброс, в каждом варианте (контроль, микроспоридиоз и кокцидиоз) медианы выборки, соответствующие среднему значению относительной доли положительных по ФО гемоцитов каждого сверчка, формируют устойчивые группы. В контроле они занимают диапазон от 40 до 50 %, при микроспоридиозе — 10—25 и при кокцидиозе — 70—80 % (рис. 4).

Активность карбоксилэстераз выявляется в виде темно-коричневых точек (продукта реакции с нафтилацетатом), диффузно распределенных по всей цитоплазме гемоцитов и присутствующих в той или иной степени во всех форменных элементах. При этом интенсивность окрашивания разных типов клеток существенно различается. Так, веретеновидные плазматоциты и прогемоциты почти не окрашены; в клетках присутствует лишь незначительное число гранул продукта реакции. Небольшая группа клеток окрашена немного интенсивнее, однако ядро в них также различимо, а гранулы распределяются диффузно. Третья группа клеток интенсивно окрашивается в коричневый цвет, границы гранул и ядро клетки неразличимы (рис. 3, В). 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 варьирует от 0 до 80 %, однако наиболее часто встречающиеся значения (медианы выборок) лежат в области 40—60 %. Значения долей гемоцитов с положительной реакцией у насекомых, зараженных кокцидиями, находятся в этом же диапазоне и соответствуют максимальным контрольным значениям. При микроспоридиозе, напротив, относительная доля клеток с положительной реакцией в большинстве случаев достоверно ниже, чем в других вариантах, и обычно не превышает 10—20 % (Соколова, Сундуков, 1999).

Характерно, что опыт по выявлению фенолоксидазной и эстеразной активности гемоцитов на одних и тех же особях, зараженных микроспоридиями и кокцидиями, показал одновременное снижение доли окрашенных клеток при микроспоридиозе как в результате реакции с ДОФА, так и с нафтилацетатом.

Активность ферментов, катализирующих образование активированных кислородных метаболитов (АКМ). Продукция АКМ фиксировалась нами по восстановлению

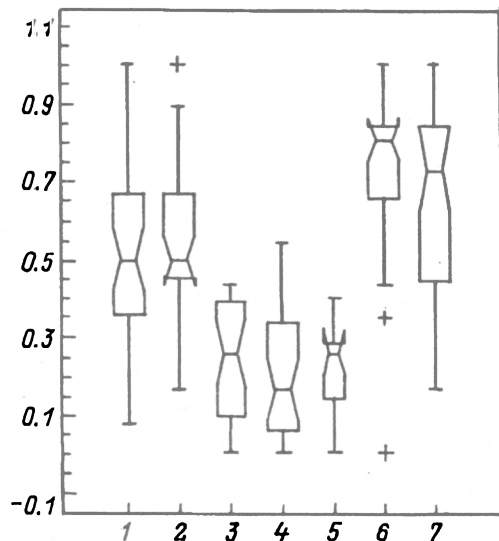


Рис. 4. Фенолоксидазная активность, выявленная гистохимически (реакция с ДОФА) в монослоях гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus* в контроле (варианты 1, 2), при заражении микроспоридией *Nosema grylli* (варианты 3—5) и кокцидией *Adelina grylli* (варианты 6, 7).

По оси абсцисс — варианты опыта; на оси ординат — относительная доля фенолоксидазоположительных гемоцитов. 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 (по результатам однофакторного дисперсионного анализа).

Fig. 4. The phenoloxidase activity detected by histochemical methods in haemocyte monolayers of *Gryllus bimaculatus* in control (variants 1, 2), infected with the microsporidia *Nosema grylli* (variants 3—5), and coccidia *Adelina grylli* (variants 6, 7).

нитросинего тетразолия (НСТ). Продукт реакции выявляется в гранулоцитах в виде мелких темно-синих точек, вероятно соответствующих скоплению митохондрий или пероксисом (рис. 3, Г). Добавление к инкубационной среде бактериального липополисахарида (ЛПС) приводило к активации реакции «кислородного взрыва» в виде повышения доли положительно окрашенных клеток в контроле и при микроспориidioзе, однако в контроле степень активации была значительно выше, чем при микроспориidioзе (данные не приводятся).

ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология гемоцитов у сверчка типична для насекомых и типы клеток хорошо идентифицируются по классификации Гупта (Gupta, 1985). Присутствие переходных форм между прогемоцитами, плазматоцитами и гранулоцитами подтверждает так называемую «single-cell theory», в соответствии с которой типы гемоцитов (во всяком случае, ряда Пр—Пл—Гр) представляют собой последовательные этапы дифференциации прогемоцитов (стволовых клеток). При этом клетки, находящиеся на соответствующем этапе дифференцировки, выполняют определенные функции (Gupta, 1985).

Вероятно, при заражении патогенами или при других стрессах активируются механизмы регуляции дифференцировки прогемоцитов, которые приводят к образованию пула тех или иных типов клеток. Так, судя по нашим наблюдениям, при микроспориidioзе сверчка заметно увеличивается доля гранулоцитов и незначительно снижается доля плазматоцитов. Последнее можно истолковать как результат участия фагоцитирующих плазматоцитов в защитных реакциях (слипания, осаждения на поверхности органов и т. д.), что ведет к их элиминации из русла гемолимфы. То, что относительная доля плазматоцитов уменьшается незначительно, видимо, свидетельствует о том, что в изученных особях сверчков уровень разрушения зараженной ткани и поступления спор в гемолимфу был небольшим.

Нами также впервые для *Orthoptera* отмечено наличие коагулоцитов, которые появляются в гемолимфе сверчка при активации заражением кокцидией *A. grylli*. Как и у других насекомых (Gupta, 1985; Götz, Voman, 1985), коагулоциты и гранулоциты сверчков участвуют в формировании капсулы вокруг патогена.

Выявленное нами достоверное уменьшение числа фенолоксидазоположительных гемоцитов при микроспориidioзе говорит об угнетении ФО активности в этих клетках, которое может быть результатом ингибирования непосредственно ФО или ФО-каскада, либо следствием активации ингибиторов последнего в гемолимфе. Дальнейшие исследования помогут выявить механизм наблюдаемого явления. Известно, что некоторые паразиты насекомых: энтомопатогенные грибы (Hung, Voucias, 1995), скребни (Brennan, Cheng, 1975), трематоды (Сухачева и др., 1998), перепончатокрылые наездники (Vinson, 1990) подавляют защитные реакции хозяев путем ингибирования фенолоксидазной активности гемолимфы. Вероятно, угнетение ФО есть результат адаптации микроспориидий к паразитированию в насекомых (так же, как в случае переносимых паразитов). К сожалению, нам ничего не известно о динамике ФО активированности гемолимфы других насекомых при микроспориidioзах.

Одно из возможных объяснений — снижение числа ФО- и эстеразоположительных клеток происходит вследствие общего истощения организма хозяина, сопровождающегося изменениями белкового и аминокислотного состава в клетках (Weidner e. a., 1999), тем более что *N. grylli* паразитирует в жировом теле, которое имеет тесную морфофункциональную связь с популяцией клеток гемолимфы. С другой стороны, при ДСН-электрофорезе не выявлено различий в составе цитозольных белков гемоцитов контрольных и микроспориidioзных сверчков (Токарев, неопубликованные данные). Отсутствием субстратов из-за общего истощения хозяина объясняется снижение ФО активности у личинок кровососущих насекомых (клопов и двукрылых) при паразитировании в их гемолимфе гоноксенных трипаносоматид. В отличие от

микроспориоза при этом нарушается меланизация кутикулы, снижается уровень тирозина и других аминокислот, участвующих в процессе меланизации (Schaub, 1992).

Анализируя собственные и литературные данные по влиянию микроспориоза на активность эстеролитических ферментов в тканях насекомых (Кольчевская, Кольчевский, 1988; Ефименко, 1989; Соколова, Сундуков, 1999), мы предполагаем, что подавление эстеразной активности хозяев характерно для микроспориозидей насекомых. Не исключено, что подавление М ФО активности популяции гемоцитов опосредовано влиянием М на эстеразы гемолимфы хозяина, в том числе на эстеразу, активирующую ФО-каскад.

Внутриклеточная локализация дает возможность М избежать воздействия защитной системы гемолимфы вплоть до стадии массовой спорогонии, когда при разрушении пораженных клеток и выпадении спор последние могут подвергаться фагоцитозу и инкапсуляции гемоцитами. На нашей модели паразито-хозяинной системы мы наблюдали характерные клеточные реакции на присутствие спор в гемолимфе. Электронограммы гемоцитов чешуекрылых при заражении М также демонстрируют картины фагоцитоза спор (Соколова, 1990). Отсутствие реакции инфильтрации зараженной ткани гемоцитами совпадает с данными Брукса и Крэнфорда (Brooks, Cranford, 1978) о подавлении М (*N. heliothidis*) этой реакции во взрослых особях хозяина.

У кокцидий только часть жизненного цикла проходит внутри клетки. Ко времени формирования очага инвазии, содержащего ооцисты паразита, происходит расселение стадий жизненного цикла кокцидий — мерозоитов в жировом теле. При инфильтрации зрелых очагов кокцидиоза гемоцитами, инкапсуляции и меланизации ооцист в данном очаге, в других местах происходит заражение клеток жирового тела мерозоитами. Это обуславливает характерный вид меланизированного жирового тела кокцидиозных сверчков.

Наши наблюдения подтверждают возможность выживания и размножения М в гемоцитах и диссеминации инфекции по организму сверчка, как, по всей видимости, происходит при микроспориозах чешуекрылых (Соколова, 1990). О возможности размножения М в гемоцитах свидетельствует то, что отдельные клетки гемолимфы полностью забиты спорами паразита, что трудно объяснить фагоцитозом. При этом гемоцит (Пр или Пл) окружается оболочкой, хорошо заметной в световой микроскоп (предположительно состоящей из уплощенных гемоцитов), и превращается в образование, подобное тератоцистам и мегалоцистам, возникающим при заражении чешуекрылых перепончатокрылыми или простейшими, в том числе и микроспориозидеями (Weiser, 1969). Аналогами таких образований у рыб являются ксеномы, образуемые М рода *Loma*, которые тоже формируются при заражении гранулоцитарных нейтрофилов (*neutrophile granulocyte*) (Lom, Pekkarinen, 1999). В «ксеномоподобных» клетках сверчка не выявляется активности ФО, что не позволяет трактовать это образование как типичный «узелок». Формирование немеланизированной и, следовательно, нетоксичной капсулы вокруг клетки, содержащей паразитов, может быть одним из механизмов избегания иммунной системы хозяина. Для понимания значения этих образований требуются дополнительные ЭМ исследования.

Полученные данные о влиянии М на активацию реакции «кислородного взрыва» в присутствии ЛПС, вероятно, связаны с подавлением М ФО активности популяции гемоцитов, поскольку ряд АКМ может образовываться в результате меланогенеза (Narri e. a., 1995). Однако имеющихся результатов недостаточно для окончательных выводов.

Возможно, подавление эстеразной и ФО активности популяции гемоцитов и, как следствие, угнетение защитных реакций хозяина, является одной из причин высокой патогенности М и связано с повышенной чувствительностью зараженных насекомых к неблагоприятным факторам окружающей среды (Исси, 1986).

Благодарности. Авторы сердечно благодарят проф., д. б. н. Ирму Викторовну Исси за творческое обсуждение полученных экспериментальных данных и за тщательный критический анализ рукописи этой статьи.

Работа поддержана РФФИ 97-04-48383 и ФЦП Интеграция № К-0955.

Список литературы

- Андреева Р. В. Материалы по патологии слепней (Diptera, Tabanidae), пораженных микозами // Патология членистоногих и биологические средства борьбы с вредными организмами. Тез. докл. Первой Киев. город. конф. Киев, 1974. С. 14—16.
- Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978. 396 с.
- Глулов В. В., Бахвалов С. А. Механизмы резистентности насекомых при патогенезе // Усп. совр. биол. 1998. Т. 21. С. 57—71.
- Глулов 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.
- 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.
- Козлов М. П., Надеина В. П., Чумакова И. В. Клетки гемолимфы блох и их фагоцитарная активность // Паразитология. 1988. Т. 22, вып. 4. С. 321—325.
- Кольчевская Е. Н., Кольчевский А. Г. Анализ множественных форм неспецифических эстераз гусениц капустной совки, зараженных микроспоридиями *Vairimorpha antherae* // Бюл. ВИЗР. 1988. Т. 69. С. 18—21.
- Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К. Окислительный стресс при воспалении // Успехи совр. биол. 1997. Т. 117, № 2. С. 155—171.
- Паскерова Г. Г., Соколова Ю. Я., Добровольский А. А. Особенности патогенеза жирового тела сверчка *Gryllus bimaculatus* при кокцидиозе, вызванным аделеидной кокцидией *Adelina grylli* // Паразитология. 1998. Т. 32, вып. 5. С. 457—463.
- Серебров В. В. Изменение спектра эстераз гемолимфы чешуекрылых при микозах // Тез. Всерос. конф. «Взаимоотношения паразита и хозяина». М., 1998. С. 59.
- Соколова Ю. Я. Ультраструктурные изменения в клетках чешуекрылых при микроспоридиозе и их роль в оценке патогенных форм микроспоридий. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: ВИЗР, 1990. 25 с.
- 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.
- Соколова Ю. Я., Сундуков О. В. Подавление активности эстераз как особенность патогенеза микроспоридиоза сверчков *Gryllus bimaculatus* // Паразитология. 1999. Т. 33, вып. 6. С. 527—536.
- Сухачева Г. А., Крюкова Н. А., Сербина Е. И. Влияние трематод на биохимические параметры популяции личинок стрекоз р. *Aeshna* // Тез. Всерос. конф. «Взаимоотношения паразита и хозяина». М., 1998. С. 63.
- Шульман С. С., Добровольский А. А. Паразитизм и смежные с ним явления // Паразитол. сб. 1977. С. 230—248.
- Ashida M., Yamazaki H. I. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation // Molting and metamorphosis. Ed. Ohnishi E., Ishizaki H. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press; Berlin: Springer-Verlag, 1990. P. 239—265.
- Brennan B. M., Cheng T. S. Resistance of *Moniliformis dubius* to the defense reactions of the american cockroach, *Periplaneta americana* // J. Invertebr. Pathol. 1975. Vol. 26. P. 65—73.
- Brooks W. M., Cranford J. D. Host-parasite relationships of *Nosema heliothidis* Lutz and Splendore // Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 1978. Vol. 11. P. 51—63.
- David A., Weiser J. Role of hemocytes in the propagation of a microsporidian infection in larvae of *Galleria mellonella* // J. Invertebr. Pathol. 1994. Vol. 63. P. 212—213.
- Ditrich O., Cross M. F., Jones J., Hense J., Enriquez F. J. Strategies of microsporidial evasion of macrophage killing // Abstr. 2nd Workshop on Microsporidiosis and Cryptosporidiosis in Immunodeficient Patients. Ceske Budejovice, June 30—July 3. 1997. P. 19.
- 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, N 2. P. 246—249.
- Glupov V. V. Cell-mediated haemolytic activity of haemolymph from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) // Cytobios. 1996. Vol. 86. P. 35—51.

- Götz P., Boman H. Insect Immunity // *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 3. Ed. Kerkut G. H., Gilbert L. I. 1985. P. 453—485.
- Gupta A. P. Cellular elements in the haemolymph // *Ibid.* P. 401—451.
- Hung S. Y., Boucias D. G. Phenoloxidase activity in hemolymph of naive and *Beauveria bassiana*-infected *Spodoptera exigua* larvae // *J. Invertebr. Pathol.* 1995. Vol. 67, N 1. P. 35—40.
- Lackie A. M. Haemocyte behavior // *Adv. Insect Physiol.* 1988. Vol. 21. P. 83—178.
- Laporte F., Doussiere J., Mechin V., Vignais P. V. NADPH—cytochrome c reductase from rabbit peritoneal neutrophils. Purification, properties and function in the respiratory burst // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 196. P. 59—66.
- Leonard C., Ratcliffe N. A., Rawley A. F. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells // *J. Insect Physiol.* 1985. Vol. 31, N 10. P. 789—799.
- Lom J., Pekkarinen M. Ultrastructural observations on *Loma acerinae* (Jirovec, 1930) comb. nov. (Phylum Microsporidia) // *Acta Protozoologica*. 1999. Vol. 38. P. 61—74.
- Nappi A. J., Vass E., Frey F., Carton Y. Superoxide anion in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites // *European J. Cell Biol.* 1995. N 68. P. 450—456.
- Nigam Y., Maudlin I., Welburn S., Ratcliffe N. A. Detection of phenoloxidase activity in the haemolymph of tsetse flies, refractory and susceptible to infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense* // *J. Invertebr. Pathol.* 1997. Vol. 69. P. 279—281.
- Nouman K. Synthetic pyrethroid insecticides: structures and properties // *Chemistry of Plant Protection*. Vol. 4. Ed. Bowers W. S., Ebing W., Martin D., Wegler R. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 1990. 241 p.
- Ratcliffe N. A. Invertebrate immunity — a primer for the nonspecialist // *Immunol. Lett.* 1985. Vol. 10. P. 252—270.
- Ratcliffe N. A., Leonard C., Rowley A. F. Prophenoloxidase activation, non-self recognition and cell cooperation in insect immunity // *Science*. 1984. Vol. 26. P. 557—559.
- Ratcliffe N. A., Walters J. B. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae // *J. Insect Physiol.* 1983. Vol. 29, N 5. P. 407—415.
- Schaub G. The effects of Trypanosomatids on Insects // *Advances in Parasitology*. 1992. Vol. 31. P. 255—319.
- Söderhall K., Smith V. J. Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods // *Dev. Comp. Immunol.* 1983. Vol. 7. P. 229—239.
- Sokolova J. Y., Butaeva F. B., Dolgikh V. V. Light- and electronmicroscopic observations on life cycle stages of *Adelina grylli* Butaeva 1996 (Sporozoa, Adeleidae) from fat body of cricket *Gryllus bimaculatus* // *Protistology*. 1999. Vol. 1, N 1. P. 34—42.
- Vinson S. B. How parasitoids deal with the immune system of their host: an overview // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1990. Vol. 3. P. 3—27.
- Weidner E., Findley A. M., Dolgikh V., Sokolova J. Microsporidian biochemistry and physiology // *The microsporidia and microsporidiosis*. Ed. Wittner M. Washington: D. C., 1999. P. 172—195.
- Weiser J. Immunity of insects to Protozoa // *Immunity to parasitic animals*. Ed. Jackson G. J. e. a. N. Y.: Appleton—Century—Crofts, 1969. P. 129—147.
- Weiser J., Beard R. L. *Adelina sericesthis* n. sp., a new coccidian parasite of scarabaeid larvae // *J. Insect Pathol.* 1959. Vol. 10, N 1. P. 99—106.

ВИЗР РАСХН, 189620, СПб.—Пушкин;
Институт систематики и экологии животных СО РАН

Поступила 27.01.2000

MORPHOFUNCTIONAL ANALYSIS OF HAEMOCYTES OF THE CRICKET *GRYLLUS BIMACULATUS* (ORTHOPTERA: GRYLLIDAE) DURING SHARP MICROSPORIDIOSIS CAUSED BY *NOSEMA GRYLLI* (MICROSPORIDIA: NOSEMATIDAE)

Ju. Ya. Sokolova, Yu. S. Tokarev, Ya. L. Lozinskaya, V. V. Glupov

SUMMARY

Key words: microsporidiosis, *Nosema grylli*, *Gryllus bimaculatus*, haemocytes, defense reactions, phenoloxidase, esterase activities, ROS production.

Microsporidians (M) are supposed to be ancient eukaryotic parasites with a broad range of animal hosts, being especially abundant in Arthropoda. They are supposed to pass a long way of adaptation to parasitism, that usually means inhibiting or avoiding host immune reactions alongside with the reduction of pathogenicity. However M, unlike other eukaryotic obligate parasites, preserved a high pathogenicity, comparable with one of viruses, and thus they could be expected to possess a unique mode of interactions with their hosts. The goal of the present work is to assess how M influence the cellular immune response of an insect host.

Experiments were performed on the host-parasite system *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) — *Nosema grylli* (Microsporidia, Nosematidae); coccidia *Adelina grylli* — infected crickets were used to compare the host cellular response against two pathogens. Haemocytes (H) were observed using phase contrast and electron microscope. H smears were stained for a phenoloxidase (PO), esterase activities and «respiratory burst» reaction. Five H type can be distinguished in the cricket haemolymph. (1) Prohaemocytes, relatively small (13—30 µm) cells with large nuclei, are observed both in control and infected insects. (2) Plasmotocytes, round (30—35 µm in diameter) or fusoid (40—63 × 13—38 µm) cells, can hardly be distinguished from (1) ultrastructurally; during the coccidian infection of the cricket fat body these H infiltrate the infected organ and turn into amebocytes with lacinate nuclei, they usually contain electron dense granules, that release during the formation of a capsule around the coccidian oocytes. (3) Granulocytes (Gr, 20—33 µm in diameter) are cells with the extremely refractive cytoplasm when observed in phase contrast microscope, they contain vacuoles with typical crystal needle-like inclusions. The transitional forms between the mentioned above three cell types can be observed. The next two H types also observed on H monolayers are supposed to be the specialized forms of Gr: (4) coagulocytes, cells with the fragile cytoplasm that are easily disintegrated after a contact with a pathogen; they have been described in Orthoptera for the first time now; (5) spherulocytes, giant cells filled with electron lucid granules and small, often eccentrically located nucleus. Both H types were observed only after infection with *A. gryllus* in the vicinity of encapsulated oocysts. Infection with M does not cause such intensive concentration of haemocytes near the infected organ, or so abundant nodule formation, until the acute stage of the disease when M spores are liberated from the destroyed cells and contact the insect haemolymph. Thereafter, the number of granulocytes significantly increases. In the presence of M spores, haemocytes produce long cytoplasm protrusions and form clumps. Some spores adhere to the haemocyte surface and are phagocytized. Giant round cells loaded with spores, can be observed in the host lymph. They are surrounded by a sheath composed of flattened cells and resemble xenomas, described for fish microsporidiosis.

A. grylli caused the increase in the quote of PO-positively stained cells up to 80 % from 40—50 % in control, that well corresponds to the host immune reactions activation and melanization of infected tissue, while microsporidiosis significantly reduced quote of PO⁺ cells. Carboxyl esterase activity expressed as quote of positively stained cells was 40—60 % in naive and coccidia-parasitized samples, M decrease this number to 10—20 %. «Respiratory burst» reaction, detected by reducing of NBT, did not alter significantly in microsporidia-infected insects. From the presented data it can be concluded: 1) M do not suppress such cellular reactions as a clamp formation and phagocytosis of spores, liberated from the infected tissue; 2) at the same time they suppress activities of enzymes involved in immune response.

Supported by CFP «INTEGRACIA» N K-0955 and RFBR N 97-04-43383.

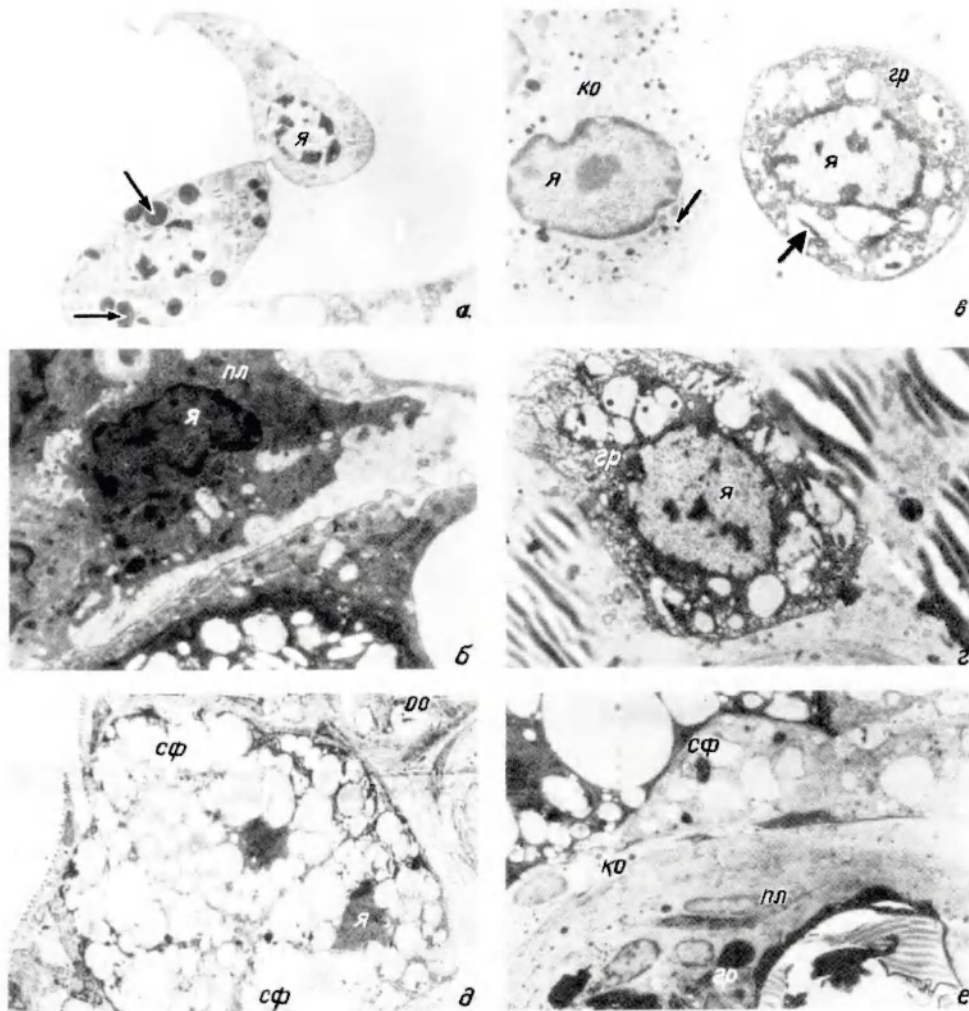


Рис. 2. Ультраструктура гемоцитов *Gryllus bimaculatus* при заражении кокцидией *Adelina grylli*.
 а — срез через гемоциты типа плазматоцитов или прогемоцитов, стрелки — округлые гранулы умеренной электронной плотности; б — плазматоциты вблизи зараженных участков жирового тела сверчка; в — в поле зрения гранулоцит и коагулоцит, толстая стрелка — игловидные включения в электронно-прозрачные секреторные гранулы гранулоцита, тонкая стрелка — мелкие электронноплотные гранулы в цитоплазме коагулоцита; г — гранулоцит вблизи участка жирового тела, содержащего макрогамонты и ооцисты кокцидии; д — срез через участок жирового тела сверчка, содержащий ооцисты кокцидии, крупные клетки с мелким ядром — сферулоциты; е — концентрические слои из гемоцитов различных типов образуют «узелок» вокруг ооцист и спороцист кокцидий; оо — ооцисты кокцидий; сф — сферулоциты.
 Остальные обозначения, как на рис. 1. Увел. а — 8000х; б-г — 6000х; д — 3000х; е — 2000х.

Fig. 2. Ultrastructure of haemocytes from *Gryllus bimaculatus* infected with *Adelina grylli*.