

ВЛИЯНИЕ СПОР МИКРОСПОРИДИЙ НА ФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В ГЕМОЦИТАХ СВЕРЧКОВ *GRYLLUS* SPP. (INSECTA: ORTHOPTERA) IN VITRO

© Ю. С. Токарев

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург — Пушкин, 196608;
электронный адрес: jumacro@yahoo.com

После инкубации со спорами микроспоридий *Paranosema* spp. в монослое гемоцитов сверчков наблюдали значительное снижение доли клеток, дающих положительную реакцию в гистохимическом тесте на фенолоксидазную (ФО) активность. Споры микроспоридии *P. grylli* вызывали снижение этого показателя в 3 и 5.4 раза при контакте в течение 1 ч с гемоцитами сверчков *Gryllus bimaculatus* и *G. argentinus* соответственно. Способность спор *P. grylli* снижать долю ФО-положительных клеток в монослое гемоцитов *G. bimaculatus* была выражена сильнее при более длительном времени инкубации (2 ч), а также при использовании более свежих образцов спор (с более высокой инфекционной активностью). Обработка спор *P. grylli* антибиотиками уменьшала их способность снижать долю ФО-положительных гемоцитов. Наибольшее снижение — почти в 27 раз — отмечено при инкубации гемоцитов *G. bimaculatus* со спорами *P. locustae*, высокопатогенным паразитом, способным заражать прямокрылых насекомых-хозяев исключительно широкого круга и сохранять высокий уровень инфекционности на протяжении длительного времени вне организма хозяина. Тесная корреляционная связь выявлена между уровнем инфекционности спор микроспоридий и их способностью к подавлению активности ФО-системы — ключевого фактора иммунитета насекомых.

Ключевые слова: микроспоридии, прямокрылые насекомые, гемоциты, фенолоксидазная система, *Paranosema grylli*, *Paranosema locustae*, *Gryllus bimaculatus*, *Gryllus argentinus*.

Принятые сокращения: ДОФА — 3,4-дигидроксифенилаланин, ФР — физиологический раствор, содержащий Трис (рН 7.2), ФО — фенолоксидаза.

Фенолоксидазная (ФО) система гемолимфы насекомых выполняет разнообразные физиологические функции и занимает ключевое место в формировании комплекса защитных реакций в ответ на нарушение целостности внутренней среды организма при инфекционном процессе, интоксикации, травмировании и прочих неблагоприятных воздействиях окружающей среды (Götz, Voman, 1985). Компоненты ФО-каскада беспозвоночных участвуют в процессах неспецифического распознавания чужого, опсонизации чужеродных клеток, меланизации инкапсулированных паразитов, детоксикации ядов, патогенных метаболитов и свободных радикалов, а также запуска других каскадных систем защиты (Gillepsie et al., 1997).

Токсическое действие продуктов метаболизма меланина зарегистрировано на паразитах различных групп — вирусах (Porham et al., 2004), бактериях, протистах (Hillyer et al., 2003), в том числе микроспоридиях (Tokarev et al., 2007), грибах, гельминтах (Götz, Voman, 1985) и насекомых-энтомофагах (Carton, Nappi, 1997). У насекомых компоненты ФО-комплекса находятся в гемолимфе и в свободноциркулирующих гемоцитах, реализующих основной объем клеточных защитных реакций. Доля ФО-положительных гемоцитов служит важным показателем в определении напряженности иммунного статуса

насекомых, в том числе при инфекционном патогенезе (Глулов, Бахвалов, 2001). Паразиты насекомых — как макро-, так и микроорганизмы — используют разнообразные способы избегания или подавления защитных реакций организма хозяев; при этом ФО-система и иммунокомпетентные клетки являются одной из наиболее частых мишеней иммуносупрессивных стратегий паразитов.

Снижение активности ФО в гемолимфе и гемоцитах и подавление реакции меланизации выявлены при наступлении острой фазы микроспоридиоза прямокрылых и чешуекрылых насекомых, сопровождающейся массовым накоплением спор паразита (Соколова и др., 2000; Токарев, 2003; Воронцова и др., 2004; Tokarev, Sokolova, 2005).

Цель настоящей работы — проверить гипотезу о том, что споры микроспоридий обладают супрессивным действием в отношении системы меланогенеза насекомых-хозяев на примере кратковременной культуры гемоцитов сверчков.

Материал и методика

Разведение насекомых и микроспоридий. Двупятнистого сверчка *G. bimaculatus* и аргентинского сверчка *G. argentinus* содержали в стандартных условиях,

описанных ранее (Токарев, 2003). Для заражения личинок III—IV возрастов на вату поилки наносили суспензию спор микроспоридии *Paranosema grylli* в концентрации 10^7 спор в 1 мл. Поилки помещали в садки с насекомыми на 1 нед. Через 2—3 мес насекомых вскрывали, жировое тело гомогенизировали и центрифугировали 10 мин при 500 g и 4 °C. Надосадочную жидкость и верхние слои осадка удаляли, а нижний слой белого цвета, состоящий из спор микроспоридий, ресуспендировали в дистиллированной воде и отмывали многократным центрифугированием при условиях, указанных выше. Водную суспензию очищенных спор хранили при 4 °C и использовали для заражения сверчков и в экспериментах, описанных ниже.

Для тестов со спорами микроспоридии *P. locustae* использовали суспензию спор, выделенных из жирового тела перелетной саранчи по аналогичной методике.

Тест на инфекционность спор *P. grylli*. Жизнеспособность спор микроспоридии *P. grylli* оценивали с помощью модифицированного метода стимуляции выстреливания (экструзии) спор *in vitro* (Kurtti et al., 1994). Для этого споры последовательно инкубировали в следующих растворах: 1) 10 mM раствор динатриевой соли ЭДТА, содержащий 1 mM Трис, pH 6.8—7, 30 мин; 2) активирующий раствор 0.01 N KOH, содержащий 0.17 M KCl, 40 мин; 3) нейтрализующий раствор, содержащий 25 mM Трис, 0.17 M KCl, 10 mM ЭДТА, 30 mM глюкозы, pH 8.0, 30 мин. После этого подсчитывали число выстреливших спор в световом микроскопе Микромед-2 (ЛОМО, Санкт-Петербург).

В качестве вариантов использовали споры, хранившиеся в течение 1—2 нед (свежевыделенные споры) и в течение 1 года после выделения, а также свежевыделенные споры, обработанные раствором пенициллина (5 ед./мл) и стрептомицина (500 мкг/мл) в течение 12 ч при 37 °C.

Культура гемоцитов сверчков *in vitro*. Насекомых охлаждали в течение 30 мин при 4 °C и стерилизовали поверхность тела 70%-ным этанолом. Гемолимфу сверчков отбирали в антикоагулянт, содержащий 100 mM NaOH, 150 mM NaCl, 17 mM ЭДТА и 40 mM лимонной кислоты (pH 4.6), на ледяной бане. Гемоциты осаждали центрифугированием (500 g, 5 мин, 4 °C), ресуспендировали в охлажденной культуральной среде Митцухаши и Марамороша (Sigma, Германия) и подсчитывали концентрацию клеток в гемоцитометре Нойбауэра (BRAND, Германия). Суспензию гемоцитов смешивали с суспензией спор микроспоридий в соотношении 1 : 10. В качестве контроля использовали гемоциты без добавления спор микроспоридий. Смесь гемоцитов и спор высевали в лунки камеры FLEXiperm (Sarstedt, Германия), прикрепленной к предметному стеклу, из расчета $3 \cdot 10^5$ гемоцитов на лунку (Токарев и др., 2005). Монослои гемоцитов со спорами инкубировали при 25 °C, после чего использовали для гистохимических тестов.

Активность ФО выявляли гистохимически по описанной методике (Соколова и др., 2000), модифицированной для условий данного исследования. Для этого монослои гемоцитов (после снятия камеры FLEXiperm с предметного стекла) дважды промывали физиологическим раствором (ФР: 10 mM Трис, 150 mM NaCl, pH 7.2) и фиксировали абсолютным метанолом в течение 5 мин. Затем фиксатор удаляли и добавляли в лунки с монослоями гемоцитов 2 mM раствор 3,4-дигидроксибензилаланина (ДОФА) в ФР. Монослои гемоцитов инкубировали в

течение 1 ч при 37 °C, после чего промывали их проточной водой и высушивали.

При подсчете в световом микроскопе клетки, потемневшие в результате реакции с ДОФА, учитывали как ФО-положительные, а светлые — как ФО-отрицательные. Для каждого варианта использовали четыре монослоя гемоцитов. В каждом монослое подсчет доли ФО-положительных клеток производили в 50 полях зрения и рассчитывали среднее значение. Степень снижения доли ФО-положительных клеток определяли как соотношение средних значений в эксперименте и в соответствующем контрольном варианте.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc.). Различия между экспериментальным и контрольным вариантами, а также между степенями снижения доли ФО-положительных клеток оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента (*t*-test, independent, by variables). Для выявления корреляционных связей между уровнем инфекционности спор и степенью снижения доли ФО-положительных клеток использовали непараметрический корреляционный анализ (Spearman rank R) в отношении соответствующих рядов данных, представленных в табл. 2.

Результаты

Жизнеспособность спор микроспоридий. При искусственной стимуляции *in vitro* наблюдали выстреливание около 70 % свежевыделенных спор микроспоридии *P. grylli*. Только 6.8 ± 2.3 % ($n = 117$) спор, хранившихся в виде водной суспензии свыше 1 года при 4 °C, сохраняли способность к экструзии, т. е. их жизнеспособность снизилась в 10 раз. Потерю способности к экструзии *in vitro*, а также к заражению насекомых-хозяев при длительном хранении спор микроспоридий данного вида неоднократно наблюдали ранее (Токарев, 2003; Семенов, 2004). Среди спор, обработанных антибиотиками, способность к экструзии сохраняли лишь 22.4 ± 3.2 % ($n = 165$), что также свидетельствует о частичной потере жизнеспособности спор (табл. 1).

Влияние спор микроспоридий на активность ФО в монослое гемоцитов. Использование первичной культуры гемоцитов сверчков позволило изучить непосредственное влияние спор микроспоридий на состояние популяции свободноциркулирующих клеток насекомых-хозяев, что значительно затруднено в условиях паразито-хозяйинной модели *in vivo*. Во всех вариантах контакта спор микроспоридий с гемоцитами сверчков в сравнении с контрольными вариантами наблюдали снижение доли ФО-положительных клеток. При этом выявили следующие закономерности.

1. Влияние времени инкубации. При инкубации монослоя гемоцитов сверчка *G. bimaculatus* со спорами микроспоридий *P. grylli* в течение 1 ч доля ФО-положительных клеток составила 11.13 ± 1.36 против 33.54 ± 2.10 % в контроле. Через 2 ч инкубации показатели в эксперименте и контроле достигали 6.13 ± 1.17 и 30.73 ± 2.30 % соответственно (рис. 1). Таким образом, если через 1 ч инкубации доля ФО-положительных клеток под действием спор микроспоридий снизилась в 3 раза, то через 2 ч — в 5 раз; различие статистически достоверно при $P = 0.01$. Следовательно, ингибирующее влияние спор микроспоридий на ФО-систему гемоцитов насекомых за-

Т а б л и ц а 1

**Определение инфекционности спор микроспоридии *Paranosema grylli*
методом искусственной стимуляции экстружии in vitro**

Варианты спор микроспоридий	Просмотрено спор	Из них выстрелило	Доля жизнеспособных спор, %
Свежевыделенные, образец 1	196	138	70.4 ± 3.3 ^a
Свежевыделенные, образец 2	134	92	68.7 ± 4.0
Хранение в течение 1 года	117	8	6.8 ± 2.3
Обработанные антибиотиками	165	69	22.4 ± 3.2

Примечание. ^a Здесь и в табл. 2 доли указаны в виде среднего значения с ошибкой процента.

висит от времени контакта с клеткой-мишенью, что необходимо учитывать при постановке тестов и сравнении результатов различных экспериментов.

2. Влияние вида насекомого — донора гемоцитов. При инкубации монослоя гемоцитов сверчков со спорами микроспоридий *P. grylli* в течение 1 ч в случае с гемоцитами *G. argentinus* доля ФО-положительных клеток в эксперименте и контроле составила 4.37 ± 0.99 и 23.63 ± 2.14 % соответственно (рис. 2). Следовательно, в опытном варианте для гемоцитов *G. argentinus* этот показатель снизился в 5.4 раза по сравнению с контролем, тогда как для гемоцитов *G. bimaculatus* снижение составило 3 раза, как сказано выше. Различие между степенью снижения доли ФО-положительных клеток сверчков двух видов под действием спор микроспоридий статистически достоверно при $P = 0.0$). О возможности заражения аргентинского сверчка микроспоридиями и, следовательно, о патогенезе микроспоридиоза и инфекционных свойствах спор *P. grylli* по отношению к насекомым данного

вида сведений нет, что не позволяет делать выводы о физиологическом значении выявленного различия.

3. Влияние срока хранения спор. При инкубации монослоя гемоцитов сверчка *G. bimaculatus* со спорами микроспоридий *P. grylli*, хранившимися в течение 18 мес при 4 °С, доля ФО-положительных клеток составила 16.94 ± 1.70 против 33.53 ± 2.10 % в контроле (рис. 3), т. е. степень снижения доли ФО-положительных гемоцитов по сравнению с контролем составила 2 раза, тогда как для свежих спор — 3 раза (см. выше); различие статистически достоверно при $P = 0.01$. Можно предположить, что при утрате спорами инфекционности в ходе длительного хранения снижается способность к подавлению ФО-системы насекомых-хозяев.

4. Влияние обработки спор антибиотиками. В отдельном эксперименте монослоем гемоцитов сверчка *G. bimaculatus* инкубировали как с нативными спорами *P. grylli*, так и со спорами, обработанными антибиотиками. Доля ФО-положительных клеток в этих двух вариантах соста-

Т а б л и ц а 2

**Зависимость степени снижения доли ФО-положительных гемоцитов
от уровня инфекционности спор микроспоридий**

Варианты спор микроспоридий	Повторность	Доля ФО ⁺ -гемоцитов, %		Снижение доли ФО ⁺ -клеток	ИС ^a
		эксперимент	контроль		
<i>Paranosema grylli</i> ; хранились в течение 1 года	1	16.94 ± 3.369	31.82 ± 4.965	2	1
	2	17.65 ± 4.135	32.69 ± 3.756	1.9	1
	3	18.02 ± 3.648	37.50 ± 4.419	1.9	1
	4	15.15 ± 2.791	32.17 ± 3.906	2.2	1
<i>Paranosema grylli</i> ; обработаны антибиотиками	1	13.83 ± 3.561	25.37 ± 3.759	1.7	1
	2	19.58 ± 3.318	24.11 ± 3.602	1.2	1
	3	15.63 ± 3.210	21.77 ± 3.706	1.5	1
	4	13.68 ± 3.177	20.93 ± 4.387	1.7	1
<i>Paranosema grylli</i> ; свежевыделенные	1	12.95 ± 2.848	31.82 ± 4.965	2.6	2
	2	9.63 ± 2.539	32.69 ± 3.756	3.5	2
	3	10.53 ± 3.521	37.50 ± 4.419	3.2	2
	4	11.41 ± 2.344	32.17 ± 3.906	2.9	2
<i>Paranosema locustae</i>	1	1.75 ± 1.228	31.82 ± 4.965	19.2	3
	2	1.04 ± 1.053	32.69 ± 3.756	32.3	3
	3	1.41 ± 0.989	37.50 ± 4.419	23.8	3
	4	0.85 ± 0.845	32.17 ± 3.906	39.5	3

Примечание. ^a ИС (инфекционность спор) для *P. grylli* определена как 1 (низкая) и 2 (средняя) на основании данных табл. 1 и из: Токарев, 2003, для *P. locustae* — как 3 (высокая) на основании данных из: Henry, Oms, 1981.

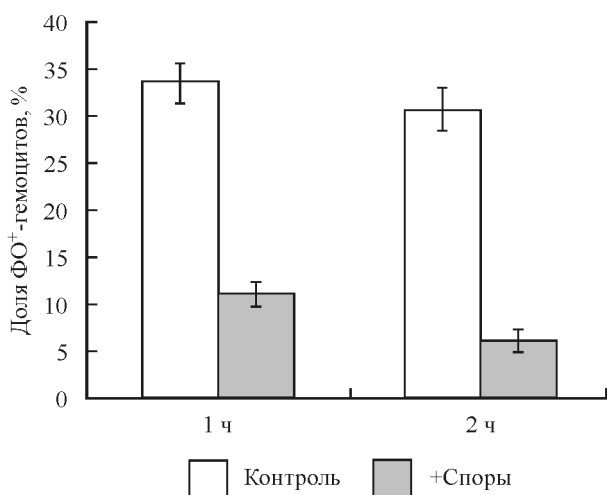


Рис. 1. Влияние времени инкубации на способность спор микроспоридий *Paranosema grylli* вызывать снижение доли ФО-положительных (ФО⁺) клеток в монослое гемоцитов сверчков.

Здесь и на рис. 2—5 доля ФО⁺ указана в виде среднего значения с ошибкой процента ($\pm m\%$) для вариантов с добавлением спор микроспоридий и без них (Контроль).

вила 7.53 ± 1.23 и 15.68 ± 1.65 % соответственно против 23.05 ± 1.91 % в контроле (рис. 4). Таким образом, если нативные споры вызвали снижение доли ФО-положительных гемоцитов в 3.2 раза, то обработанные антибиотиками споры — только в 1.5 раза (достоверно при $P = 0.01$).

5. Влияние вида паразита. Наиболее значительное снижение доли ФО-положительных клеток (до 1.26 ± 0.51 %) наблюдали при инкубации монослоя гемоцитов со спорами микроспоридии *P. locustae*. В случае *P. grylli* это снижение составило 11.13 ± 1.36 против 33.53 ± 2.10 % в контроле (рис. 5). Это соответствует снижению рассматриваемого показателя под воздействием спор *P. locustae* в 28.7 раза, что почти в 10 раз больше, чем в варианте со спорами *P. grylli*. Такое различие подавляющего действия, на наш взгляд, связано со значительно более высоким инфекционным потенциалом *P. locustae* (Henry, Oma, 1981; Lomer et al., 2001; Sokolova, Lange, 2002).

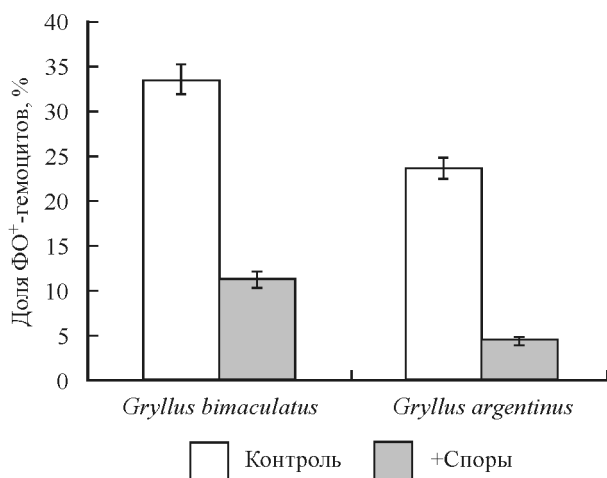


Рис. 2. Влияние вида насекомого (сверчка *Gryllus bimaculatus* или *G. argentinus*) на способность спор микроспоридий *Paranosema grylli* вызывать снижение доли ФО-положительных клеток в монослое гемоцитов сверчков.

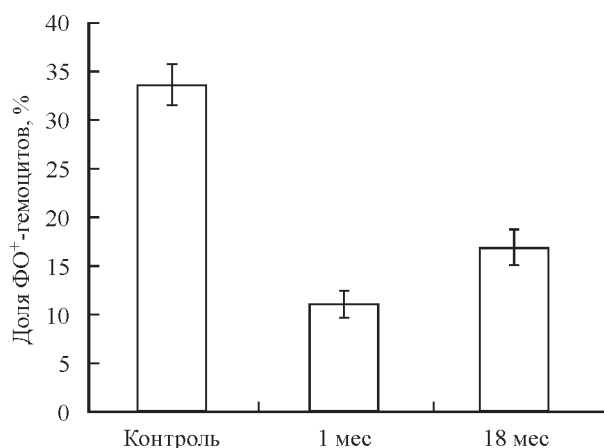


Рис. 3. Влияние срока хранения на способность спор микроспоридий *Paranosema grylli* вызывать снижение доли ФО-положительных клеток в монослое гемоцитов сверчков.

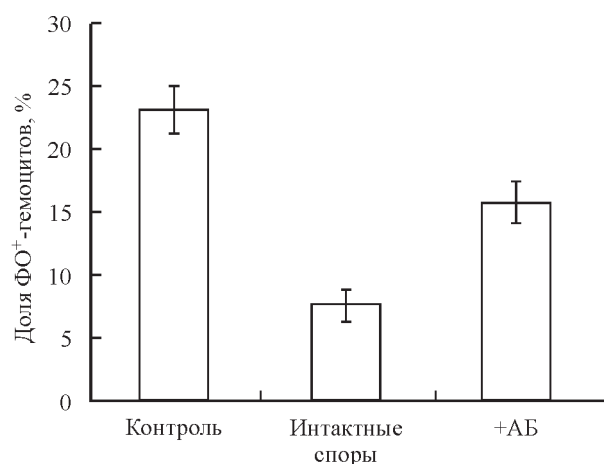


Рис. 4. Влияние обработки антибиотиками (+АБ) на способность спор микроспоридий *Paranosema grylli* вызывать снижение доли ФО-положительных клеток в монослое гемоцитов сверчков.

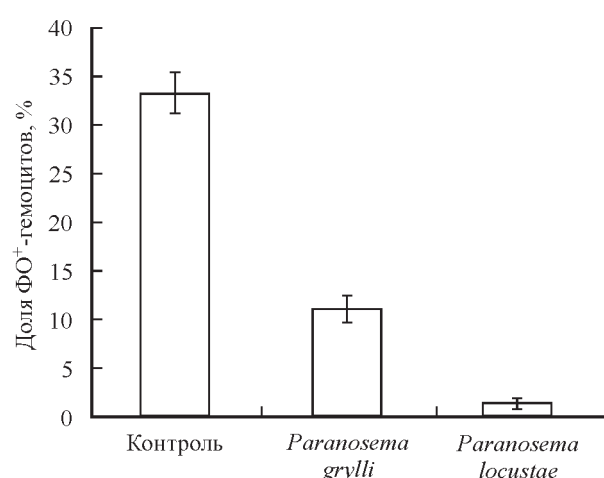


Рис. 5. Влияние вида паразита на способность спор микроспоридий вызывать снижение доли ФО-положительных клеток в монослое гемоцитов сверчков.

Корреляция между инфекционностью спор и степенью снижения доли ФО-положительных клеток. По результатам тестирования спор на гемоцитах *G. bimaculatus* споры разделили на три группы: 1) низкой инфекционности (*P. grylli*), длительного срока хранения или обработанные антибиотиками; 2) средней инфекционности (*P. grylli*), свежие; 3) высокой инфекционности (*P. locustae*). В вариантах со спорами низкой, средней и высокой инфекционности доля ФО-положительных гемоцитов снижалась по сравнению с контролем в 1.5—2.3 и 28.7 раза соответственно (усредненные данные, табл. 2). Корреляционный анализ выявил наличие тесной связи между степенью снижения доли ФО-положительных клеток и уровнем инфекционности спор: коэффициент корреляции $r = 0.92$ при $P = 0.01$.

Обсуждение

Изменение доли ФО-положительных клеток в монослое гемоцитов в условиях описанного эксперимента может быть вызвано различными факторами. В частности, помимо иммуносупрессивного действия, предполагаемого для инфекционных стадий развития (спор) микроспоридий, причиной снижения доли ДОФА-реактивных клеток могла послужить частичная дегрануляция иммунокомпетентных клеток, вызванная контактом с чужеродным объектом (Götz, Voman, 1985). Однако эта причина не объясняет наличия корреляции между уровнем инфекционности спор и степенью снижения доли ФО-положительных гемоцитов. В связи с этим представляется более вероятным предположение наличия у активных спор микроспоридий механизма ингибирования того или иного звена ФО-активирующего каскада. Это свойство можно рассматривать как приспособление микроспоридий к паразитированию в насекомых, так как именно споры контактируют с иммунокомпетентными клетками животных-хозяев на различных этапах инфекционного процесса. Адаптивное преимущество такой иммуносупрессивной способности подтверждает тот факт, что продукты меланогенеза при защитных реакциях прямокрылых насекомых оказывают тератогенное воздействие на микроспоридий *Paranosema* spp., нарушая нормальный процесс спорогенеза (Tokarev et al., 2007).

Способность спор микроспоридий негативно влиять на ФО-систему гемоцитов, обнаруженная в настоящей работе, объясняет подавление реакции меланизации (Воронцова и др., 2004), снижение доли ФО-положительных гемоцитов (Соколова и др., 2000) и ФО-активности гемолимфы (Лозинская, 2002) у зараженных насекомых при массовом накоплении спор паразита, а также у насекомых, в полость тела которых были инъецированы споры микроспоридий (Tokarev et al., 2003). Кроме того, спорогенез *P. locustae* при развитии микроспоридий в перелетной саранче сопровождается значительно более сильным подавлением реакции меланизации насекомого-хозяина по сравнению с микроспоридиозом двукрылого сверчка, вызываемого *P. grylli* (Tokarev, Sokolova, 2005; Tokarev et al., 2007). Указанное различие в подавлении спорами микроспоридий реакции меланизации насекомых-хозяев соответствует различию уровня снижения доли ФО-положительных клеток в монослое гемоцитов, выявленному для данных видов паразитов в настоящей работе.

Полученные результаты согласуются также и с данными, полученными на экспериментальных моделях in

vitro, которые свидетельствуют об ингибирующем влиянии спор микроспоридий разных видов на процессы фагоцитоза (Shaw et al., 2001), фаголизосомальной дегградации (Weidner, Sibley, 1985) и окислительного взрыва (Leiro et al., 2001) иммунокомпетентных клеток животных-хозяев. Резкое снижение генерации активных кислородных метаболитов в гемоцитах насекомого-хозяина выявлено и в системе in vivo при развитии микроспоридии *Vairimorpha ephestiae* в организме пчелиной огневки на этапе массового спорообразования (Лозинская, 2002).

Автор выражает благодарность Г. Р. Ледневу (ВИЗР, Санкт-Петербург) за консультации по статистическому анализу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-00005).

Список литературы

- Воронцова Я. Л., Токарев Ю. С., Соколова Ю. Я., Глунов В. В. 2004. Микроспоридиоз пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), вызываемый *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Burenellidae). Паразитология. 38 (3): 239—250. (Vorontsova Ya. L., Tokarev Yu. S., Sokolova Yu. Ya., Glupov V. V. 2004. Microsporidiosis in the wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) caused by *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Burenellidae). Parasitologiya. 38 (3): 239—250.)
- Глунов В. В., Бахвалов С. А. 2001. Структурно-функциональные особенности гемоцитов при патогенезе. В кн.: Патогены насекомых: структурно-функциональные аспекты. М.: Круглый год. 513—523. (Glupov V. V., Bakhvalov S. A. 2001. Structural and functional features of haemocytes during pathogenesis. In: Insect pathogens: structural and functional aspects. M.: Kruglyi god. 513—523.)
- Лозинская Я. Л. 2002. Изменение активности детоксицирующих ферментов и антиоксидантного статуса личинок *Galleria mellonella* L. при микроспоридиозе: Автореф. канд. дис. Новосибирск: ИСиЭЖ СО РАН. 19 с. (Lozinskaya Ya. L. 2002. Changes of activities of detoxifying enzymes and antioxidative status of *Galleria mellonella* L. during microsporidiosis. Synopsis of Ph. D. thesis. Novosibirsk: ISEA SB RAS. 19 p.)
- Семенов П. Б. 2004. Особенности структурных белков спор микроспоридии *Paranosema grylli*, паразитирующей в сверчке *Gryllus bimaculatus*: Автореф. канд. дис. СПб.—Пушкин: ВИЗР. 20 с. (Semenov P. B. 2004. Features of structural proteins of spores of spores of microsporidium *Paranosema grylli* infecting cricket *Gryllus bimaculatus*. Synopsis of Ph. D. thesis. St. Petersburg—Pushkin: ARRIPP. 20 p.)
- Соколова Ю. Я., Токарев Ю. С., Лозинская Я. Л., Глунов В. В. 2000. Морфофункциональный анализ гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) в норме и при остром микроспоридиозе, вызываемом *Nosema grylli*. Паразитология. 32 (4): 408—419. (Sokolova Ju. Ya., Tokarev Ju. S., Lozinskaya Ia. L., Glupov V. V. 2000. A morphofunctional analysis of the hemocytes in the cricket *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae) normally and in acute microsporidiosis due to *Nosema grylli*. Parasitologiya. 32 (4): 408—419.)
- Токарев Ю. С. 2003. Защитные реакции гемолимфы прямокрылых насекомых при микроспоридиозе: Автореф. канд. дис. СПб.—Пушкин: ВИЗР. 21 с. (Tokarev Yu. S. 2003. Defensive reactions of orthopteran insects haemolymph during microsporidiosis. Synopsis of Ph. D. thesis. St. Petersburg—Pushkin: ARRIPP. 21 p.)
- Токарев Ю. С., Соколова Ю. Я., Энцерот П. 2005. Первичная культура гемоцитов, выделенных из *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae), и их взаимодействие in vitro с двумя внутриклеточными паразитами — *Paranosema grylli* (Microsporidia) и *Adelina grylli* (Coccidia). Цитология. 47 (6): 478—486.

- (Tokarev Yu. S., Sokolova Yu. Ya., Entzeroth R. 2005. Establishment of a primary culture of haemocytes isolated from *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) and their interactions with two intracellular parasites: *Paranosema grylli* (Microsporidia) and *Aedina grylli* (Coccidia). Tsyntologiya. 47 (6) : 478—486.)
- Carton Y., Nappi A. J. 1997. Drosophila cellular immunity against parasitoids. Parasitol. Today. 13 : 218—227.
- Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42 : 611—643.
- Götz P., Boman H. G. 1985. Insect immunity. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Vol. 3. Integument, respiration and circulation. Oxford; Frankfurt: Pergamon Press. 454—485.
- Henry J. E., Oma E. A. 1981. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. In: Microbial control pest and plant diseases 1970—1980. London etc.: Acad. Press. 574—586.
- Hillyer J. F., Schmidt S. L., Christensen B. M. 2003. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and Plasmodium sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. J. Parasitol. 89 : 62—69.
- Kurti T. J., Ross S. B., Liu Y., Munderloh U. G. 1994. In vitro developmental biology and spore production in *Nosema furnacalis* (Microspora: Nosematidae). J. Invertebr. Pathol. 15 : 43—48.
- Lomer C. J., Bateman R. P., Johnson D. L., Langewald J., Thomas M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. Annu. Rev. Entomol. 46 : 667—702.
- Leiro J., Iglesias R., Parama A., Sanmartin M. L., Ubeira F. M. 2001. Effect of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) infection on respiratory burst responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) phagocytes. Fish Shellfish Immunol. 11 : 639—652.
- Popham H. J., Shelby K. S., Brandt S. L., Coudron T. A. 2004. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. J. Gen. Virol. 85 : 2255—2261.
- Shaw R. W., Kent M. L., Adamson M. L. 2001. Phagocytosis of *Loma salmonae* (Microsporidia) spores in Atlantic salmon (*Salmo salar*), a resistant host, and chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), a susceptible host. Fish Shellfish Immunol. 11 : 91—100.
- Sokolova Y. Y., Lange C. E. 2002. An ultrastructural study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from three species of Acrididae (Orthoptera). Acta Protozool. 41 : 229—237.
- Tokarev Y. S., Morzhina E. V., Vorontsova Y. L., Svezhova N. V., Sokolova Y. Y. 2003. Interactions of microsporidia with insect immune system: infection of haemopoietic tissue and blood cell proliferation in Orthoptera. Abstr. 10th Confr. Ciliate Biol. and 4th Europ. Congr. Protistol. San Benedetto del Tronto (AP), Italy. 61.
- Tokarev Y. S., Sokolova Y. Y. 2005. Cellular immune reactions of orthopteran insect host to microsporidia. Folia Parasitol. 52 : 12A—13A.
- Tokarev Y. S., Sokolova Y. Y., Entzeroth R. 2007. Microsporidia-insect host interactions: teratoid sporogony at the sites of host tissue melanization. J. Invertebr. Pathol. 94 : 70—73.
- Weidner E., Sibley L. D. 1985. Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion. J. Protozool. 32 : 311—317.

Поступила 13 III 2016

INFLUENCE OF MICROSPORIDIAN SPORES ON PHENOLOXIDASE ACTIVITY IN THE HAEMOCYTES OF *GRYLLUS* SPP. (INSECTA: ORTHOPTERA) *IN VITRO*

Yu. S. Tokarev

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg—Pushkin, 196608;
e-mail: jumacro@yahoo.com

After incubation with spores of microsporidia *Paranosema* spp. during 1—2 h, the quotes of *Gryllus* spp. haemolymph cells giving positive reaction in histochemical assay for phenoloxidase (PO) activity were significantly lower as compared to the control. Spores of microsporidia *P. grylli* caused 3- and 5.4-fold decrease of this index in haemocyte monolayers of *Gryllus bimaculatus* and *G. argentinus*, respectively. The ability of *P. grylli* spores to decrease the quote of PO-positive cells in *G. bimaculatus* haemocyte monolayers was stronger when monolayers and spores had been coincubated for a longer period (2 h) and when the spores used were more fresh (with higher level pf infectivity). Treatment of *P. grylli* spores with antibiotics resulted in diminishing their ability to decrease the quote of PO-positive cells. The highest level of decrease of this index, being 28.7-fold, was registered when *G. bimaculatus* haemocytes had been incubated with spores of *P. locustae*, the highly aggressive parasite which is able to infect orthopteran insect hosts belonging to more than 100 species and to preserve a high level of infectivity for years. Strong correlation has been revealed between infectivity of microsporidian spores and their ability to suppress PO system, which is a key factor in invertebrate immunity.

Key words: microsporidia, Orthoptera, haemocytes, phenoloxidase system, *Paranosema grylli*, *Paranosema locustae*, *Gryllus bimaculatus*, *Gryllus argentinus*.