

УДК 595.771 : 579.83

**ЦИТОПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ЭНДОТОКСИНОВ
BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENISIS
НА КИШЕЧНИК ЛИЧИНОК КОМАРОВ Aedes Aegypti**

© И. А. Залунин, С. Ю. Чайка, М. А. Дронина, Л. П. Ревина

С помощью электронной микроскопии изучена динамика патологических изменений в ультраструктуре кишечника личинок II возраста комара *Aedes aegypti* при их обработке токсинами Cry11A и Cry4B *Bacillus thuringiensis israelensis*. Показано, что наибольшие ультраструктурные изменения в кишечнике личинок происходят в области средней кишки. Цитоплазма клеток подвергается дезинтеграции, в ней образуются удлинённые лакуны. Количество микроворсинок уменьшается, либо они разрушаются. Перитрофическая оболочка смещается в полость средней кишки. В ультраструктуре клеток эпителия и кутикулярной выстилки передней и задней кишки не отмечено каких-либо изменений по сравнению с контролем. Наиболее сильные разрушения эпителия средней кишки происходят под действием токсина Cry4B.

Бактерия *Bacillus thuringiensis israelensis* является эффективным средством борьбы с вредными насекомыми, в частности с переносчиками трансмиссивных болезней человека и животных. Инсектицидная активность *Bacillus thuringiensis* связана с наличием белков, известных как δ -эндотоксины, которые продуцируются бактерией в процессе споруляции.

Эндотоксины *B. thuringiensis* представляют собой целый класс белков, которые различаются первичной структурой и специфичностью энтомоцидного эффекта. Например, эндотоксины, относящиеся к группе Cry1, токсичны в отношении Lepidoptera; Cry3 — для личинок Coleoptera, Cry4 и Cry11 — Diptera. Токсины группы Cry2 обладают двойной специфичностью — к Lepidoptera и Diptera.

Эндотоксины *B. thuringiensis* имеют молекулярную массу 70 и 130 кДа. Эндотоксины с молекулярной массой 130 кДа являются протоксинами, которые превращаются в токсины с молекулярной массой 65—70 кДа под действием протеолитических ферментов, содержащихся в кишечнике насекомых. Эндотоксины с молекулярной массой 70 кДа в активации не нуждаются. Токсины обладают очень сильным патологическим действием на насекомых. Насекомые под воздействием токсинов прекращают питаться, поскольку наступает паралич кишечника, а приблизительно через 30 мин наблюдается разрушение эпителия кишечника. Показано, что патологический эффект эндотоксина выражается в отторжении эпителиальных клеток в полость средней кишки, происходит обнажение базальной мембраны и через последнюю могут проникать вегетативные бактериальные клетки (Sutter, Raun, 1967).

Вскоре после обнаружения инсектицидных свойств у *B. thuringiensis* стали изучать гистопатологический эффект токсина на организм насекомых. В наибольшей степени гистопатологическое влияние токсина изучено на гусеницах чешуекрылых и при этом установлено, что главной мишенью действия токсина является средняя кишка (Endo, Nishiitsutsuji-Uwo, 1980).

При анализе патологических изменений в кишечнике личинок IV возраста комара *Aedes aegypti* (L.) под действием кристаллов эндотоксина *B. thuringiensis* в дозе

8×10^{-6} мг/мл наблюдалось разрушение структуры эпителия средней кишки с дезинтеграцией многих клеточных органелл (Charles, de Barjac, 1983). Под действием токсина происходит утеря клетками многих микроворсинок, изменяется форма митохондрий, изменяется также структура перитрофической мембраны (Чайка и др., 2000).

После обработки кристаллами *B. thuringiensis* личинок комаров *Culex fatigans* у последних наблюдались изменения в ультраструктуре передней и задней части средней кишки (Wang, 1992). В передней части наблюдалась гипертрофия клеток, вакуолизация их цитоплазмы, но перитрофическая оболочка оставалась неповрежденной, а эпителий сохранял монослойность. Клетки задней части средней кишки были повреждены в большей степени: наблюдались лизис, общая дезинтеграция монослоя эпителия, перитрофическая оболочка разрушалась. Заметные ультраструктурные изменения были характерны для митохондрий и эндоплазматического ретикулума.

Целью настоящей работы было детальное изучение цитологического эффекта белков-токсинов Cry11A и Cry4B из *Bacillus thuringiensis israelensis* на кишечник чувствительного насекомого (комар *Aedes aegypti*).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Насекомые. Работу проводили на личинках II возраста комара *Aedes aegypti* L. (Culicidae: Diptera), которых отбирали из лабораторной культуры.

Выделение и активация энтомоцидных белков. В качестве токсинов использовали эндотоксин Cry11A и активированный эндотоксин Cry4B из *Bacillus thuringiensis israelensis*. Эндотоксины Cry4B и Cry11A выделяли из кристаллов штамма B-2395 сочетанием методов избирательной экстракции и ионообменной хроматографии на MonoQ (Кригер и др., 1999). Для получения эндотоксина кристаллы штамма B-1225 *B. thuringiensis alesti* растворяли 0.05 М карбонатным буфером, pH 10, содержащим 0.01 М ДТТ. Эндотоксин Cry4B активировали химотрипсином (1 ч, 37°, соотношение фермент : белок — 1 : 100).

До фиксации личинок подвергали обработке растворами токсинов в цитратном буфере. Токсин Cry11A применяли в концентрациях 100 и 25 нг/мл. Токсин Cry4B — 40 и 10 нг/мл. Обработку вели 15 мин, 1 и 3 ч. Эти концентрации были больше или меньше значений LC50, определенных в ходе настоящей работы. Контрольных личинок выдерживали в цитратном буфере в течение 3.5 ч.

Определение LC50 белковых токсинов Cry11A и Cry4B. Эксперименты по биотестированию проводили на личинках *A. aegypti* II возраста. Для более эффективного улавливания фильтрующим аппаратом личинок токсины осаждали, добавляя 1 М лимонную кислоту до pH 4.5. В работе использовали по 5 концентраций суспензии каждого токсина: для Cry11A — 250, 60, 15, 4 и 1 нг/мл; для Cry4B — 60, 15, 4, 1 и 0.25 нг/мл. По 10 мл суспензии каждой концентрации переносили в пластиковые контейнеры, в которые затем помещали 10 личинок. Контрольных насекомых содержали в 0.05 М Na-цитратном буфере, pH 4.5. Насекомых выдерживали при 28° в течение суток и подсчитывали процент погибших. Все эксперименты проводили в 6 повторностях. Величину LC50 находили методом пробит-анализа.

Электронно-микроскопическое исследование. Личинок последовательно фиксировали в 2.5 %-ном растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH 7.3) и 2 %-ном растворе четырехоксида осмия, в том же буфере. В процессе обезвоживания в серии возрастающих концентраций этилового спирта материал контрастировали уранилацетатом (насыщенный раствор в 70 %-ном спирте). После полного обезвоживания материала провели его заливку в смесь смол ЭПОН. Срезы, приготовленные на ультрамикротоме LKB, контрастировали раствором уранилацетата в 70 %-ном этиловом спирте и окрашивали цитратом свинца по методу Рейнольдса. Изучение и фотографирование срезов проводили на электронном микроскопе JEM-100B.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Личинки II возраста (контроль). Для выявления характера патологических изменений в эпителии кишечника личинок комаров под действием эндотоксина сначала нами детально исследовалась ультраструктура эпителия контрольных личинок II возраста.

Средняя кишка состоит из однослойного эпителиального пласта. В состав эпителия средней кишки входят столбчатые клетки, имеющие типичное строение, свойственное транспортирующим эпителиям. У таких клеток апикальная поверхность покрыта микроворсинками, а базальная часть клеток преобразована в базальный лабиринт. С внешней стороны эпителий выстлан базальной мембраной. Вокруг эпителия средней кишки расположены продольные и поперечные слои мышц. Форма и размер эпителиальных клеток различаются, что связано с их возрастом и функциональным состоянием.

Апикальный отдел клеток представлен микроворсинками. В переднем отделе средней кишки микроворсинки зачастую не образуют правильного слоя, и их длина составляет около 1 мкм. В заднем отделе средней кишки длина микроворсинок увеличивается до 2,5 мкм. Внутри микроворсинок обнаруживаются тонкие продольно ориентированные филаменты. С наружным слоем клеточной мембраны микроворсинок связаны нити гликокаликса. Гликокаликс, если он выявляется, имеет ширину порядка 0,02 мкм. Однако на многих микроворсинках гликокаликс не обнаруживается.

Лежащая вблизи микроворсинок перитрофическая оболочка имеет ширину 0,2—0,3 мкм. В оболочке обнаруживается несколько слоев, а при больших увеличениях (порядка 100 тыс.) в ней можно выявить и продольно ориентированные фибриллы.

Цитоплазма клеток выглядит достаточно электронно-плотной. В клетках содержится ядро диаметром около 9 мкм. Подъядерную область клетки занимает базальный лабиринт, представленный достаточно разветвленной сетью цитоплазматических тяжей, в которых содержатся митохондрии. Каких-либо сильных разрушений цитоплазмы клеток, вызванных содержанием личинок комаров в буфере перед их фиксацией, не выявлено. Не обнаружено и разрушений задней кишки.

Личинки, обработанные эндотоксином Cry11A. После инкубации личинок II возраста в присутствии 100 нг/мл эндотоксина Cry11A в течение 15 мин у них не наблюдается ярко выраженных изменений по сравнению с контролем. Клетки эпителия сохранили свою целостность. Их апикальная поверхность покрыта сравнительно небольшими (5 мкм длины) микроворсинками, в которых отчетливо видны филаменты (рис. 1, 1; см. вкл.). В основании микроворсинок лежат многие микротрубочки. Мембрана микроворсинок лишена гликокаликса. Следует отметить достаточно хорошую сохранность как ядра, так и цитоплазматических органелл, в особенности митохондрий. Базальный лабиринт имеет правильное ячеистое строение; его лакуны не формируют удлиненных крупных вакуолей. Перитрофическая оболочка имеет типичное строение. Базальная оболочка, подстилающая основание клеток, представлена аморфным слоем.

После обработки токсином, взятым в концентрации 25 нг/мл, в течение 1 ч в эпителии средней кишки не выявлено разрывов. Перитрофическая оболочка, состоящая из 4 отчетливых слоев, смещена в полость кишки (рис. 1, 2). Микроворсинки клеток, размещенных в пределах одного среза, имеют разную форму и длину: от пальцевидных 0,25 мкм длины до сильно вытянутых 2 мкм длины. В микроворсинках сохраняются продольные филаменты, а на поверхности мембран имеется гликокаликсное покрытие.

Цитоплазма клеток не подверглась сильной дезинтеграции; в ней имеются митохондрии, мембраны гранулярного ретикулула, лизосомы, электронно-плотные секреторные включения. Ядро обычной формы, а его мембрана не повреждена. В околоядерной зоне имеются удлиненные вакуоли, но они не связаны друг с другом и, следовательно, не формируют больших лакун. Базальный лабиринт хорошо развит, но не простирается до ядра. Его митохондрии имеют хорошо сохранившиеся кристы.

Обработка личинок эндотоксином *Cru11A* (25 нг/мл) в течение 3 ч вызвала следующие изменения. Эпителий средней кишки характеризуется деструктивными чертами. Перитрофическая оболочка проходит вдоль микроворсинок на расстоянии порядка 5 мкм. Микроворсинки представлены небольшими пальцевидными выростами. Характерно полное отсутствие гликокаликса на внешней стороне клеточной мембраны микроворсинок (рис. 1, 3). В цитоплазме клеток имеются длинные, направленные вдоль клеток разрывы, которые представляют собой удлинённые лакуны базального лабиринта (рис. 1, 4, 5). Последний простирается даже в надъядерную область клеток. Ядра не разрушены. Апикальная область клеток достаточно электронно-плотная, клеточные органеллы выражены не отчетливо. На некоторых препаратах наблюдается расслоение базальной мембраны с утратой ее содержимого.

Наконец, 3-часовая обработка токсином в концентрации 100 нг/мл привела к тому, что перитрофическая оболочка, состоящая из 5 слоев, смещается в полость средней кишки (рис. 1, 6). Микроворсинки апикальной поверхности размещены регулярно, но гликокаликс отсутствует. В эпителиальных клетках заметны повреждения. Среди митохондрий много раздутых, с частично утраченными кристами. В околоядерной зоне обнаруживаются удлинённые крупные вакуоли. В цитоплазме встречаются большие лизосомоподобные тела. Над базальным лабиринтом имеются крупные митохондрии с разной степенью редукции крист: от незначительной до почти полной.

Личинки, обработанные эндотоксином *Cru4B*. Обработка личинок эндотоксином *Cru4B*, взятым в концентрации 40 нг/мл, в течение 15 мин привела к существенным изменениям эпителия средней кишки. На апикальной поверхности сохраняются микроворсинки, хотя их размещение беспорядочно. Перитрофическая мембрана толщиной до 0.5 мкм размещена на значительном расстоянии от эпителия и состоит из 4 слоев, два из которых электронно-плотные (рис. 2, 7; см. вкл.). Наблюдается расслоение эпителиальных клеток на отдельные отсеки, связанное с глубоким проникновением лакун базального лабиринта в глубь клеток. Эти лакуны формируются благодаря слиянию отдельных полостей базального лабиринта.

Обработка токсином в концентрации 10 нг/мл в течение 1 ч привела к следующим изменениям. Микроворсинки клеток хотя и размещены достаточно плотно, но не образуют правильных рядов. Перитрофическая оболочка отдалена от микроворсинок. Однако в цитоплазме имеются многие клеточные органеллы, строение которых соответствует норме. Вместе с тем имеются необычно широкие лакуны базального лабиринта, особенно вокруг ядра (рис. 2, 8). Базальный лабиринт вблизи базальной мембраны имеет вид, как в норме. Регенерационные клетки сохраняют нормальный вид и строение. Но в некоторых областях формируются разрывы, рассекающие клетку от области базального лабиринта до апикального отдела.

Исследования заднего отдела кишечника не выявили каких-либо заметных деструктивных изменений.

При воздействии токсина в концентрации 10 нг/мл в течение 3 ч наиболее сильным изменениям подвергся апикальный отдел эпителиальных клеток средней кишки. Микроворсинки клеток представлены только сравнительно небольшими, нерегулярно расположенными и утолщенными выростами. Их длина порядка 0.5 мкм. Причем характерно, что такое строение имеют микроворсинки клеток, находящихся в разном функциональном состоянии, о чем свидетельствует наличие как электронно-плотных, так и электронно-прозрачных клеток. Гликокаликс отсутствует. Следует отметить наличие наряду с обычными митохондриями некоторого количества разбухших митохондрий с редуцированными кристами. В цитоплазме клеток наряду с обычными небольшими вакуолями имеются крупные вакуоли, сформировавшиеся, по-видимому, путем слияния более мелких. Базальный лабиринт имеет типичное ячеистое строение; митохондрии здесь без изменений.

Наконец, после инкубации личинок в течение 3 ч в присутствии 40 нг/мл токсина наблюдается следующая картина. Эпителий средней кишки сохраняет свою целостность. Микроворсинки встречаются как хорошо выраженные, длиной около 2 мкм, так и почти полностью редуцированные. Гликокаликс микроворсинок выражен слабо,

однако разрушений их мембраны не наблюдается. Вблизи микроворсинок проходит перитрофическая мембрана толщиной 0.4 мкм. Наибольшим деструктивным изменениям подверглись митохондрии. Они сильно раздуты, и в них почти полностью отсутствуют кристы. Такие изменения свойственны митохондриям как апикального (рис. 2, 9), так и базального (рис. 2, 10) отделов клетки. Цитоплазму клеток пронизывают длинные разветвленные вакуоли.

Базальный лабиринт сохраняет свое ячеистое строение (рис. 2, 11). В некоторых клетках он простирается почти до микроворсинок (рис. 2, 12), однако это не вызывает фрагментации эпителия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Энтомоцидные кристаллы *Bacillus thuringiensis israelensis* высокотоксичны для личинок комара *Aedes aegypti* (LC50 составляет 0.8 нг/мл). Индивидуальные эндотоксины Cry11A и Cry4B, выделенные из кристаллов, также эффективны против *Aedes aegypti*. Однако в этом случае величины LC50 (соответственно 75 и 15 нг/мл) существенно выше, чем у исходных кристаллов. Видимо, это связано с синергизмом, наблюдаемым при действии токсинов (Chilcott, Ellar, 1988).

Для изучения цитотоксического эффекта каждый из энтомоцидных белков использовали в двух концентрациях — выше и ниже (в 1.5—3 раза) его LC50. Учитывая то, что личинки комара являются фильтрующими насекомыми, токсины осаждали в цитратном буфере (рН 4.5) и применяли в виде суспензий. Предварительно было установлено, что в цитратном буфере личинки не гибнут и не замедляют своего развития.

В экспериментах по биотестированию мы показали, что как для кристаллов *Bacillus thuringiensis israelensis*, так и для отдельных токсинов характерна высокая скорость наступления токсического эффекта. При концентрациях энтомоцидных белков, даже ненамного превышающих LC50, гибель насекомых может наступить уже через 1—2 ч. Для сравнения, гибель гусениц от Cry-токсинов происходит через сутки и более. Только для личинок шелковичного червя наблюдали быстрое (в течение часа) наступление общего паралича (Endo, Nishiitsutsuji-Uwo, 1980). Быстрая гибель личинок комаров не обязательно связана с эффективностью токсинов, но может определяться биологией насекомых, например скоростью поступления пищи в кишечник. Менее вероятно, что она связана с более быстрым растворением и протеолизом кристаллов в кишечнике, тем более что содержимое кишечника *Aedes aegypti* частично инактивирует токсин Cry4B (Zalunin e. a., 1998).

Электронно-микроскопическое изучение эффекта воздействия токсинов на личинок *Aedes aegypti* показало, что основным местом приложения действия этих белков является эпителий средней кишки насекомого. Хотя эндотоксины, поступающие с пищей, проходят и через передние отделы кишечника, здесь они не оказывают заметного патологического действия. Очевидно, это связано с тем, что передний отдел кишечника выстлан толстым слоем кутикулы, но, возможно, при прохождении передней кишки эндотоксины не успевают раствориться и (в случае Cry4B) активироваться.

Значительные повреждения эпителиальных клеток возникают уже при небольших концентрациях энтомоцидных белков (0.2 нг/мл для кристаллов, 25 нг/мл для Cry11A и 10 нг/мл для Cry4B). При более высоких концентрациях (100 нг/мл для Cry11A и 40 нг/мл для Cry4B) первые видимые изменения в эпителиальных клетках возникают уже в течение 15 мин экспозиции. Подобная скорость эффекта описана и для действия Cry-белков на шелковичного червя. При инкубации гусениц шелковичного червя с кристаллами *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* и *aizawai* уже через 10—15 мин изменяется форма и протяженность базального лабиринта, частично ослаивается базальная мембрана, изменяется форма митохондрий (Endo, Nishiitsutsuji-Uwo, 1980).

Первым эффектом действия mosquitoцидных белков является отслоение перитрофической оболочки от поверхности эпителиальных клеток и изменения формы и размеров микроворсинок. В последующем микроворсинки резко редуцировались, связанный с ними гликокаликс утрачивался. Несколько позже в эпителиальных клетках наблюдались следующие изменения: происходило увеличение протяженности лакун базального лабиринта до уровня ядра или даже вплоть до апикального отдела; митохондрии раздувались и в значительной степени утрачивали кристы; в околоядерной зоне появлялись крупные и разветвленные вакуоли. Самые сильные нарушения наблюдались только при действии больших концентраций токсинов. В этом случае наблюдались разрывы базального лабиринта, сильное раздутие митохондрий и потеря ими крист. Клеточное ядро оставалось без изменений.

Все перечисленные нарушения происходят в эпителиальных клетках под действием как исходных кристаллов, так и индивидуальных токсинов. В то же время в их действии имеются и некоторые различия. Как и в случае экспериментов по биотестированию, эндотоксин Cry4B более эффективен, чем Cry11A. В свою очередь, оба эндотоксина оказывают менее выраженное разрушительное действие на клетки средней кишки по сравнению с исходными кристаллами. Это проявляется в том, что при действии индивидуальных белков: 1) в эпителиальных клетках наблюдается более низкая лизосомная активность, что может свидетельствовать о меньшей поврежденности клеточных мембран; 2) не происходит сильной фрагментации эпителиального пласта, он всегда сохраняет свою целостность; 3) не отмечено полной потери микроворсинок апикальной поверхностью клеток средней кишки, даже несмотря на изменение их формы. По всей видимости, эти отличия связаны с синергизмом, наблюдающимся при действии энтомоцидных белков. Кроме того, исходные кристаллы содержат эндотоксин CytA, обладающий выраженным цитолитическим эффектом (Chestukhina e. a., 1985).

Выявленные изменения структуры эпителиальных клеток кишечника личинок комара принципиально схожи с нарушением кишечного эпителия гусениц, производимым белками сем. Cry1 (Endo, Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Percy, Fast, 1982). Это говорит об универсальности действия всех Cry-белков на уровне цитопатологии.

Интересно сравнить полученные данные с патологическим эффектом mosquitoцидных белков из другого энтомопатогена — *Bacillus sphaericus*. Токсины *B. sphaericus* отличаются более отсроченным патологическим эффектом (у личинок комара *Culex quinquefasciatus* паралич наступает только через 24—48 ч) (Singh, Gill, 1988). При этом гистопатологические изменения в средней кишке наблюдаются через 4 ч после начала инкубации с токсинами. Сходство действия токсинов *Bacillus thuringiensis* и *B. sphaericus* проявляется в том, что первоначальные повреждения в обоих случаях происходят в эпителии средней кишки. Основное различие — в том, что с самого начала обработки токсинами *B. sphaericus* в эпителиальных клетках образуется большое, увеличивающееся со временем количество лизосомоподобных структур, что в конечном итоге через 32—36 ч приводит к самоперевариванию этих клеток. В свою очередь, при действии эндотоксинов *B. thuringiensis* индукция активности лизосом наблюдается лишь на поздних стадиях интоксикации, как ответ на цитолитические изменения в клетках.

Общая схема механизма действия эндотоксинов *B. thuringiensis* следующая (Himego, 1987). Связывание с рецептором стимулирует перестройку молекулы токсина, в ходе которой альфа-спирали проникают внутрь мембраны и образуют в ней ионные (Na^+ и K^+)-каналы. По обе стороны апикальной мембраны столбчатых клеток кишечника комаров существует градиент концентрации ионов K^+ . В апикальных мембранах ионные каналы отсутствуют. K^+ поступает внутрь клетки по градиенту концентрации только в ходе сотранспорта с аминокислотами и моносахаридами. Обратно в просвет кишечника K^+ выходит против градиента вследствие активного транспорта. При этом в обмен на калий в клетку поступает H^+ , что приводит к существенной (на три порядка) разнице в величинах pH по обе стороны апикальной мембраны. Токсин, создавая ионные каналы, индуцирует резкое поступление K^+ внутрь цитоплазмы, а

вследствие этого нарушение осмотической регуляции клетки, приводящее к ее раздуванию и лизису. Падение градиента концентрации K^+ на апикальной мембране вызывает ухудшение поступления из просвета кишечника питательных веществ и защелачивание цитоплазмы.

Список литературы

- Кригер И. В., Ревина Л. П., Костина Л. И., Буздин А. А., Залунин И. А., Честухина Г. Г., Степанов В. М. Белки из мембран личинок *Aedes aegypti*, связывающие токсины Cry4В и Cry11А *Bacillus thuringiensis* подвида *israelensis* // Биохимия. 1999. Т. 64, вып. 10. С. 81—88.
- Чайка С. Ю., Залунин И. А., Дронина М. А. Цитопатологическое влияние кристаллов эндотоксина *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* на кишечник личинок комаров *Aedes aegypti* // Роль кровососущих насекомых и клещей в лесных экосистемах России: Сборник научных работ по материалам Республиканской конференции 3—5 октября 2000 г. Великий Новгород, 2000. С. 29—33.
- Charles J.-F., de Barjac H. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L. en microscopie electronique // Ann. Microbiol. 1983. Vol. 134A, N 2. P. 197—218.
- Chestukhina G. G., Zalunin I. A., Kostina L. I., Bormatova M. E., Khodova O. M., Stepanov V. M. Structural features of crystalforming proteins, produced by *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* // FEBS Letters. 1985. Vol. 190. P. 345—348.
- Chilcott C. N., Ellar D. J. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins in vivo and in vitro // J. Gen. Microbiol. 1988. Vol. 134. P. 2551—2558.
- Endo Y., Nishiitsutsuji-Uwo J. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut // J. Invertebr. Pathol. 1980. Vol. 36, N 1. P. 90—103.
- Himero M. Mechanism of action of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* // J. Toxicol. 1987. Vol. 6, N 1. P. 45—71.
- Percy J., Fast P. G. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells // J. Invertebr. Pathol. 1982. Vol. 40. P. 90—103.
- Singh G. J. P., Gill S. S. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quiquefasciatus* larvae // J. Invertebr. Pathol. 1988. Vol. 52, N 2. P. 237—247.
- Sutter G. R., Raun E. S. Histopathology of European-corn-borer larvae treated with *Bacillus thuringiensis* // J. Invertebr. Pathol. 1967. Vol. 9. P. 90—103.
- Wang Y. The pathological studies of larvae of *Culex pipiens fatigans* infected with *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* strain 187 // 19th Int. Congr. Entomol., Beijing, June 28—July 4, 1992: Proc.: Abstr. — Beijing, 1992. P. 336.
- Zalunin I. A., Revina L. P., Kostina L. I., Chestukhina G. G., Stepanov V. M. Limited proteolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIG and CryIVB δ -endotoxins leads to formation of active fragments that do not coincide with the structural domains // J. Prot. Chem. 1998. Vol. 17, N 5. P. 463—471.

МГУ им. М. В. Ломоносова,
e-mail: biochaika@mtu-net.ru;

Поступила 15.03.2002

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Государственный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов»

CYTOPATHOLOGICAL INFLUENCE OF BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENSIS ENDOTOXINS ONTO AN INTESTINE OF AEDES AEGYPTI MOSQUITO LARVAE

I. A. Zalunin, S. Yu. Chaika, M. A. Dronina, L. P. Revina

Key words: *Bacillus thuringiensis israelensis*, toxin, midgut, larva, *Aedes aegypti*, cytopathology.

SUMMARY

The dynamics of pathological changes in the intestine of *Aedes aegypti* larvae under the influence of toxins Cry11A and Cry4B produced by *Bacillus thuringiensis israelensis* was studied by means of electron microscope. Most significant ultrastructure changes in the intestine of the second instar larvae were observed in the midgut. The cytoplasm of cells disintegrated, and elongated lacunae appeared. The number of microvilli decreased, or they disappeared in the result of destruction. The peritrophic membrane displaced to the lumen of midgut. Any changes in epithelial cells and cuticle intime of foregut and hindgut were not observed in a comparison to control. The toxin Cry4B caused the most effective destruction of the midgut epithelium.

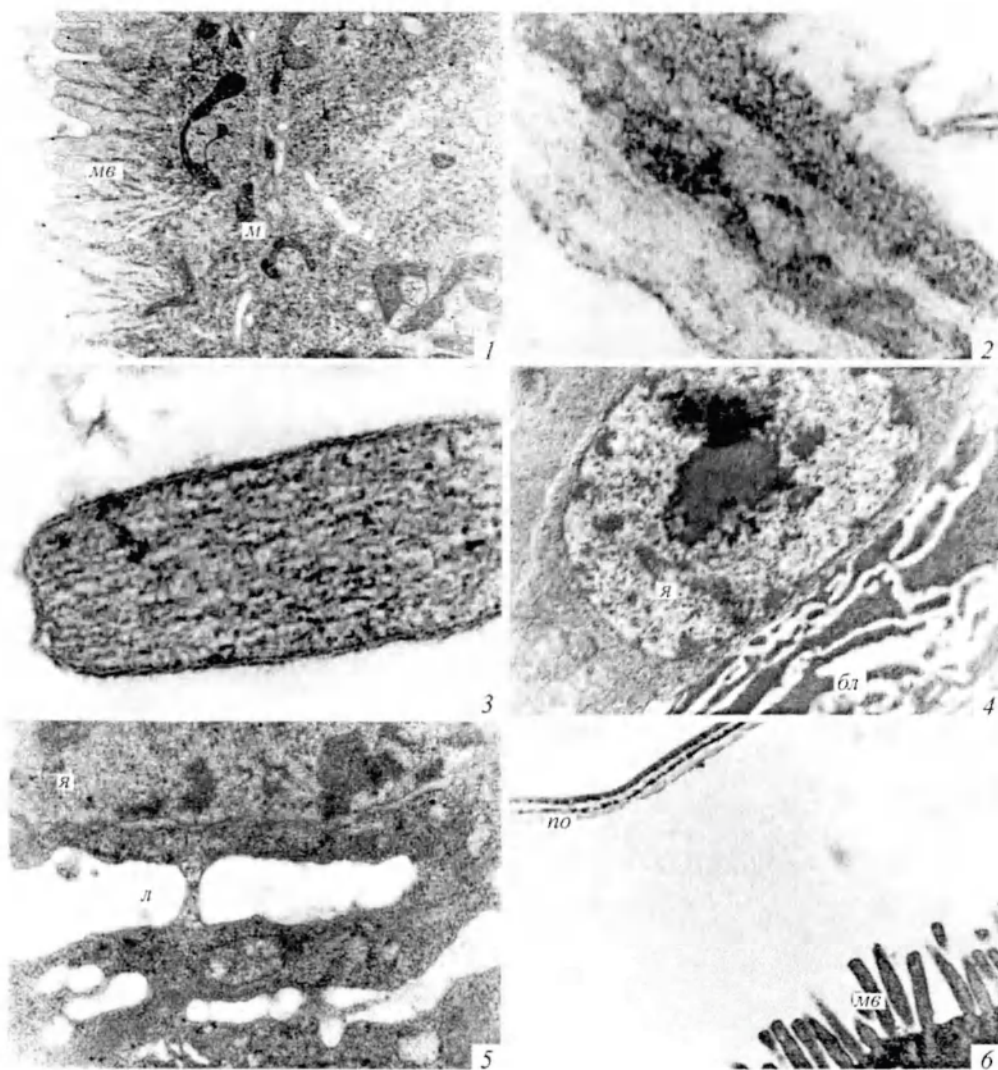


Рис. 1. Ультраструктура эпителия средней кишки личинок II возраста комара *Aedes aegypti* при действии эндотоксина Cry11A *Bacillus thuringiensis israelensis* (1—6).

1 — эпителиальная клетка средней кишки, $\times 10\,000$; 2 — перитрофическая оболочка, $\times 100\,000$; 3 — срез через микроворсинку, $\times 100\,000$; 4 — центральный отдел эпителиальной клетки, $\times 10\,000$; 5 — лакуны в цитоплазме клетки, $\times 20\,000$; 6 — апикальная поверхность эпителия со смещенной в полость кишки перитрофической оболочкой, $\times 10\,000$; бл — базальный лабиринт; л — лакуны в цитоплазме; м — митохондрии; мв — микроворсинки; по — перитрофическая оболочка, я — ядро.

Fig. 1. Ultrastructure of the midgut epithelium of *Aedes aegypti* larvae II intoxicated by Cry11A of *Bacillus thuringiensis israelensis* (1—6).

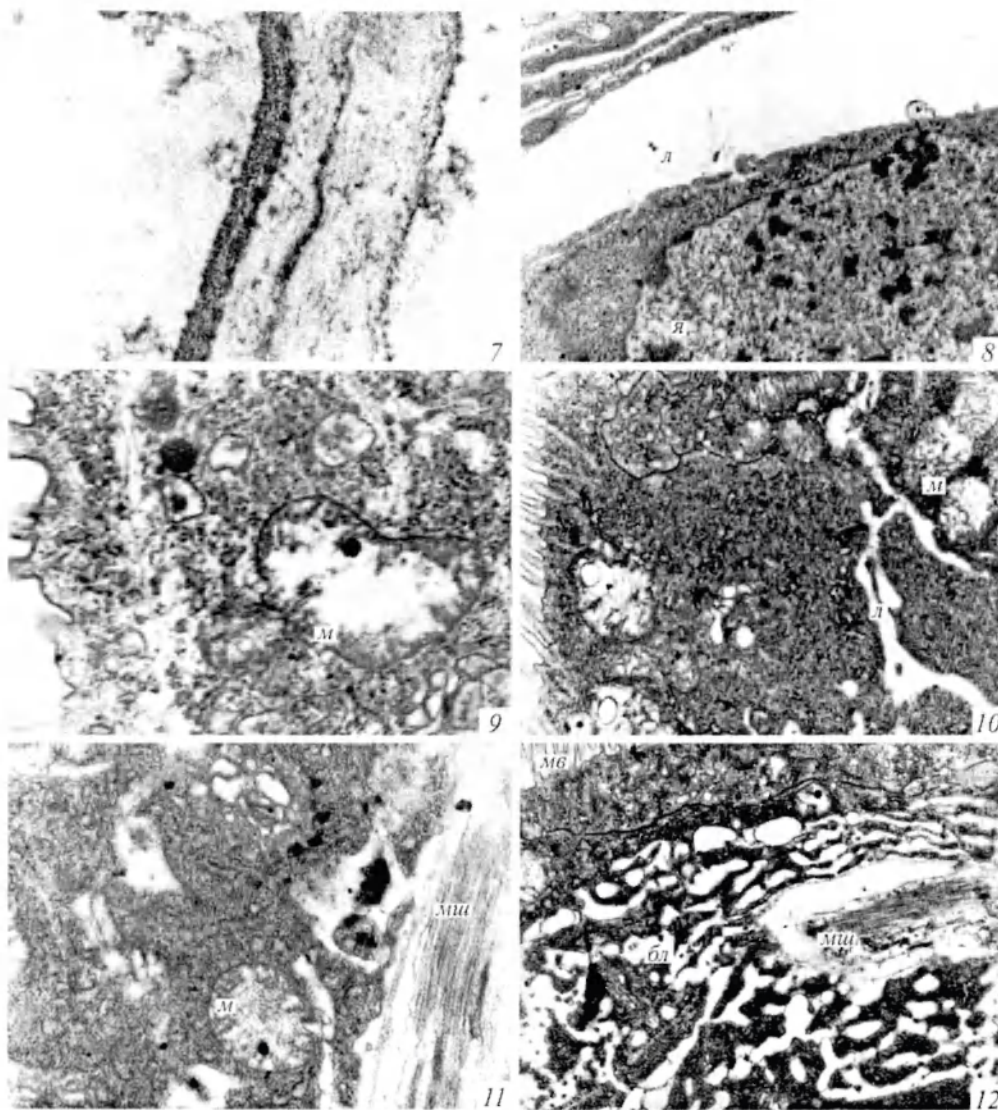


Рис. 2. Ультраструктура эпителия средней кишки личинок II возраста комара *Aedes aegypti* при действии эндотоксина Cry4B *Bacillus thuringiensis israelensis* (7—12).

7 — перитрофическая оболочка, $\times 50\,000$; 8 — центральная область клетки с большими лакунами в цитоплазме, $\times 10\,000$; 9 — апикальный отдел эпителиальной клетки, $\times 20\,000$; 10 — эпителиальная клетка, пронизанная лакунами, $\times 10\,000$; 11 — базальный отдел эпителиальной клетки, $\times 10\,000$; 12 — эпителиальная клетка с сильно развитым базальным лабиринтом, $\times 10\,000$; *ми* — мышцы.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1, 1—6.

Fig. 2. Ultrastructure of the midgut epithelium of *Aedes aegypti* larvae II intoxicated by Cry4B of *Bacillus thuringiensis israelensis* (7—12).