

И. А. МАНУКЯН

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ЛЕПТОМОНАДНОЙ ФОРМЫ *L. TROPICA*

Лейшмании и трипанозомы имеют большое значение как возбудители серьезных инвазивных заболеваний человека и животных. Изучение морфологии лейшманий с точки зрения дифференцирования различных видов и их разновидностей имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Электронномикроскопические исследования лептомонадных форм *L. tropica* проводились [6, 2] на целых клетках. Применяя метод ультратонких срезов [4, 8], позднее было дано субмикроскопическое строение *L. Donovanii*.

В данной работе нами проводилось электронномикроскопическое изучение ультраструктуры лептомонадной формы *L. tropica*.

Материал и метод. Для исследования брались лептомонадные формы *L. tropica*, штамм РКЛ, выделенный из лейшманиомы человека в Туркмении, остро некротизирующий, сельский тип. Изучали на 7—8 и 20 день культивирования в двухфазной среде (кровяной NN-агар + обогащающая жидкость). Из засеянных пробирок жидкую часть среды центрифугировали 10—15 минут при 3000 об/мин. Полученный осадок фиксировали 1% забуференным раствором осмия [11] — стандартная пропись. Были применены и другие методы фиксации: 0,2% р-р $KMnO_4$ на дистиллированной воде, 1% глутаральдегид на фосфатном буфере [10]. После фиксации обезживали в спиртах, заливали смесью бутил- и метилметакрилатов (4 : 1) с перекисью бензоила в качестве катализатора. Для заключения в метакрилат использовали желатиновые капсулы, а также металлические кольца [1]. Для контрастирования в процессе обезживания использовали 1% р-р уранил-ацетата в 70° спирте, 1%-р-р фосфорно-вольфрамовой кислоты в 100° спирте. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-Producter и дополнительно контрастировали 5% уранил-ацетатом или лимоннокислым свинцом [9].

При изучении целых клеток использовали метод негативного контрастирования фосфорно-вольфрамовой кислотой (рН 7,6—8,0).

Электронные фотографии были получены на японском электронном микроскопе УЕМ-6С.

Результаты и обсуждение. При изучении ультратонких срезов лептомонадных форм *L. tropica* установлено, что тело паразита ограничено с поверхности мембраной, имеющей гладкие очертания, и на строго поперечных срезах имеет трехслойную структуру. Толщина мембраны 100—120 Å. Она состоит из двух краевых осмиофильных слоев по 25 Å

каждый и одного осмиофобного промежуточного слоя толщиной около 50 \AA (рис. 3). Различные методы фиксации выявляют различную толщину наружного осмиофильного слоя, оставляя без изменения величину осмиофобного и внутреннего осмиофильного слоев.

В непосредственной близости к базальной части клеточной мембраны расположены трубчатые структуры (рис. 3). На строго поперечных срезах эти образования выявляются в виде двухконтурных колец и видны под оболочкой по периферии всей клетки. Диаметр этих образований 250 \AA , расстояние между их центрами $350\text{--}400 \text{ \AA}$. В стенке колец расположены 9 продольных нитей, диаметр которых $30\text{--}40 \text{ \AA}$. При косых поверхностных срезах эти образования (рис. 4) имеют вид полых цилиндров, трубок и расположены в передне-заднем направлении тела клетки. Подобные образования были описаны у *Trypanozoma lewisi* [12] и не имели связи с клеточной стенкой по данным этих исследований. Электронномикроскопическое изучение не позволяет с уверенностью судить о функции этих образований в жизнедеятельности клетки. Можно предположить, что они служат для поддержания формы тела простейшего, т. е. несут опорную функцию. Возможно также, что подобно фибриллам мионем у крупных простейших они принимают участие в сократительных процессах при движении клетки [7]. Природа данных структур изучается нами цитохимическими методами.

Клеточная мембрана непосредственно переходит на жгут, покрывая его в виде чехла (рис. 1). Под мембраной располагается пучок из 9 периферических двойных фибрилл и 2 центральных одинарных. Таким образом, «формула фибриллярного набора» равна $18+2$. На поперечном сечении (рис. 6) как центральных, так и периферических фибрилл, выявляются более электроннооптически плотная краевая и, менее плотная, центральная зоны. Диаметр фибрилл $220\text{--}250 \text{ \AA}$. На продольных срезах (рис. 5) жгута эти фибриллы выглядят в виде полых цилиндров. От внутреннего осмиофильного листка клеточной мембраны (оболочки жгута) в сторону периферических фибрилл отходят гребни. Расстояние между ними $270\text{--}300 \text{ \AA}$.

В основании жгута лежит блефаропласт (рис. 1) с «формулой фибриллярного набора» $27+0$, так как центральные фибриллы не доходят до блефаропласта. Подобная структура блефаропласта описана при изучении фибриллярных образований жгутиковых [5].

В переднем отделе тела перпендикулярно к оси жгута расположен кинетопласт (рис. 1). Он имеет почковидную форму и размер около 1 \mu в длину и $0,25 \text{ \mu}$ в ширину. Кинетопласт окружен двухконтурной мембраной, толщина которой $120\text{--}140 \text{ \AA}$. От внутреннего листка задней стенки мембраны отходят кристы. Вдоль длинной оси кинетопласта расположены фибриллярные структуры в виде спирали. Последние состоят из нитей, диаметром 70 \AA , по-видимому, представляющих собой нити

ДНК. Согласно данным некоторых исследователей [3], кинетопласт выполняет важную роль при движении клеток, координируя активность жгута, а также несет побочную генетическую функцию.

Основное вещество цитоплазмы представляют различные компоненты: мембраны, вакуоли и гранулы. Многочисленные трубочки, идущие в различных направлениях, иногда расширяясь, образуют цистерны, ограниченные мембранами с расположенными на них гранулами 100—120 Å—рибосомы. В вакуолях иногда можно видеть плотные осмиофильные включения. Прослеживается связь между эндоплазматическими кавальцами, крупными цистернами и уплощенными пузырьками, которые скапливаются в непосредственной близости к клеточной мембране.

Митохондрии (рис. 2) преимущественно располагаются под оболочкой или вблизи кинетопласта. Они не постоянны по форме и величине. По своей организации отличаются от таковых в животных клетках беспорядочным расположением крист, их количеством и числом.

Комплекс Гольджи (рис. 1) представлен вполне дифференцированной частью цитоплазмы. Как и в животных клетках, имеет вид уплощенных мешочков, цистерн, которые на срезах выглядят как плотно расположенные мембраны, лишенные гранул, скопления пузырьков и вакуолей.

Большую часть клетки занимает ядро, которое, в зависимости от плоскости среза и функционального состояния клетки, может иметь различную форму и величину (рис. 1, 2). Ядро окружено оболочкой, состоящей из двух листков по 75 Å каждый, на которых расположены гранулы по 100—120 Å—рибосомы. Их разделяет зона меньшей электронооптической плотности, около 140—150 Å, так называемая перинуклеарная зона. На строго перпендикулярных срезах выявляется трехслойность каждого листка ядерной оболочки. Ядерная оболочка пронизана порами, диаметр которых 600—800 Å. Ядро состоит из осмиофильных гранул 100—120 Å величины и менее плотных нитей 40—50 Å. Ядрышко без оболочки, содержит два вида гранул: крупные по периферии 170—180 Å и мелкие в центре 100—120 Å.

Процесс деления осуществляется путем продольного, равнодольного расщепления клетки, при этом деление кинетопласта предшествует делению ядра, за которыми следует деление цитоплазмы. Жгут не делится, а целиком переходит к одной из дочерних особей, а у другой он образуется вновь, очевидно в результате деления блефаропласта. Деление тела начинается от переднего конца и идет к заднему. В некоторых случаях деление идет неравномерно, напоминая почкование.

Ի. Ա. ՄԱՆՈՒԳՅԱՆ

L. TROPICA-Ի ԼԵՊՏՈՄՈՆԱԳՆՅԻՆ ՉԵՎԻ ՍՈՒԲՄԻԿՐՈՍԿՈՊԻԿ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ներկա աշխատության մեջ ուսումնասիրված է *L. tropica*-ի լեպտոմոնադային ձևի, PKJL շտամի ուլտրաստրուկտուրան:

Էքսպերիմենտալ նյութը՝ ֆիքսված ըստ Շյոտտրանդի մեթոդիկայի, ջրազրկված է սպիրտների բարձրացող կոնցենտրացիաներում և պարփակված է մետակրիլատներում:

Ուլտրանուրբ կտրվածքներն ստացված են LKB—Producter ուլտրաթմբի վրա, միկրոֆոտոսեկարահանումը կատարված է VEM-6C էլեկտրոնային միկրոսկոպով:

Բացառությամբ է *L. tropica*-ի հետևյալ բջջային կառուցվածքը.

1. Պարազիտի մարմինը սահմանափակված է երեքշերտանի բջջային մեմբրանով՝ 100—120 \AA :

2. Բջջային մեմբրանի հիմնային շերտի տակ գտնվում են խողովակաձևր զոյացություններ, արամադիծը 140—150 \AA :

3. Մարմնի առաջնային մասից սկսվում է մտրակը, որը կազմված է 9 պերիֆերիկ երկակի ֆիբրիլներից և 2 կենտրոնական մեկական ֆիբրիլներից:

4. Մտրակի հիմքում գտնվում է լլեֆարոպլաստը:

5. Մտրակի առանցքին ուղղահայաց գտնվում է կինետոպլաստը, որը սահմանափակված է երեքշերտանի մեմբրանով և կազմված է կրիստալներից, ֆիբրիլներից և գրանուլաններից:

6. Տիտոպլազմային մեծ մասը զբաղեցնում է կորիզը, որը շրջապատված է թաղանթով: Կորիզային թաղանթը կազմված է երկու շերտից: Յուրաքանչյուրի հաստությունը հավասար է մոտավորապես 70 \AA :

Կորիզային թաղանթն ունի թափանցող անցքեր, կորիզակը առանց թաղանթի է:

7. Գուլջի կոմպլեքսը արտահայտված է որպես ցիտոպլազմայի լրիվ կազմակերպված մի մաս:

8. Միտոխոնդրիաները տեղափոխված են հաճախ բջջային մեմբրանի տակ և կինետոպլաստի մոտ:

9. Հնդապլազմատիկ սեռիկուլումը ներկայացված է գրանուլյար և ազրանուլյար տիպի մեմբրաններով:

10. *L. tropica*-ն բաժանվում է հավասար, երկայնական ձևով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бывковский А. Ф. Вопросы вирусологии, 4, 500—501, 1961.
2. Попов Н. А., Вавилова М. П. Тр. Ташкентского научно-исследовательского ин-та вакцин и сывороток, т. VII (21), 1962.
3. Baker J. K. Jr. Roy. T Soc. Trop. Med. Hyg., 55, 5, 518—524, 1961.
4. Chang P. C. H. J. Parasitology, 42, 1, 126—136, 1956.

5. Gibbons J. R., Grimstone A. V. J. *Biophys. Biochem., Cytol.* 8, 3, 617—647, 1960.
6. Loifgren R. J. *Bacteriology*, 60, 5, 617—625, 1950.
7. Meyer H. and Porfer K. R. J. *Parasitology*, 40, 1, 16—23, 1954.
8. Pyne C. K. et Chakraborty F. J. *Protozoology*, 5, 4, 264—268, 1958.
9. Reynold S. E. J. *Cell. Biology*, 17, 1, 208—211, 1963.
10. Sabatini D. D., Benson K., Barnett R. J. J. *Cell. Biology*, 17, 1, 19—58, 1963.
11. Sjostrand F. S. J. *Cell. Comp. Phistol.* 42, 15, 1953.
12. Yudge D. M. and Anderson S. J. *Parasitology*, 50, 6, 757—762, 1964.