

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О СТРОЕНИИ  
PIROPLASMA BIGEMINUM И PIROPLASMA CANIS

Е. М. Хейсин

Лаборатория микроскопии Института цитологии АН СССР, Ленинград

С помощью реакции Фельгена и окраски по Унна изучены ядра *Piroplasma canis* и *P. bigeminum* из крови собак и крупного рогатого скота. Было установлено, что грушевидные формы этих паразитов имеют только одно ядро, содержащее небольшое скопление ДНК, в виде полулуния или серпа. Часто в ядре видна одна или две фельгенположительные гранулы. Указания авторов о наличии у пироплазм двух ядер, или ядра и блефаропласта, или двух «хроматиновых» скоплений неправильны, как основанные лишь на данных, полученных при окраске, по Гимза-Романовскому. Так называемое дополнительное ядро, блефаропласт или скопление «хроматина» не содержит ДНК, а представляют собой либо пищеварительную вакуоль, либо скопление РНК, гликогена и щелочной фосфатазы, окрашивающиеся в красный цвет, по Гимза-Романовскому.

Пироплазмы и вызываемые ими заболевания изучаются давно и многими исследователями. Однако строение этих паразитов изучено еще далеко не полно. Основные сведения о морфологии пироплазм получены более 30 лет назад. Они фигурируют в настоящее время и приводятся во многих сводках по простейшим. Между тем некоторые из этих сведений, например данные о жгутах, ризопласте, двух ядрах и т. п., вызывают сомнение и нуждаются в дальнейшем переисследовании. В старых работах всегда писали о наличии у пироплазм двух «хроматиновых» скоплений, двух «кариозом», или двух ядер разной величины. Фантам (Fantham, 1907) считал, что одно скопление хроматина представляет собой настоящее ядро, а другое — блефаропласт. Денис (Dennis, 1932) так же указывает, что у грушевидных форм *P. bigeminum*, кроме ядра, существует еще и блефаропласт, окрашивающийся так же, как и ядро. Якимов (1931) пишет даже о ядерном дуализме и считает, что это характерно для рода *Piroplasma*.

Эти данные как вполне достоверные, полученные на основании изучения паразита, окрашенного по Гимза-Романовскому, без соответствующей цитохимической проверки приводятся в работах более поздних исследователей (Чеботарев, 1951; Агринский 1953, и др.). Засухин (1965), например, не имея никакого нового фактического материала пишет о «дополнительном ядре» у пироплазм, как о совершенно точном факте. Он отмечает при этом, что «все авторы, которые изучали типичных пироплазм, описывают и рисуют у них два ядра. Видимо, одно из них является блефаропластом».

Однако уже в 1938 г. Рей (Ray), применив современную методику, показал, что у *P. bigeminum* имеется только одно ядро, хроматин которого дает положительную реакцию Фельгена. Этот же автор и Сенгупта (Ray a. Sengupta, 1956) впоследствии подтвердили эти данные, но их работы остались незамеченными, и в литературе продолжали появляться описания двух хроматиновых скоплений, или двух ядер (Riek, 1964).

Для того чтобы решить вопрос о количестве ядер у пироплазм и выяснить природу так называемого дополнительного ядра, я считал необхо-

димым, несмотря на работы Рея и Сенгупта, еще раз исследовать различные виды пироплазм с применением цитохимических методов определения нуклеиновых кислот.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовались два вида — *Piroplasma bigeminum* и *P. canis*. Паразиты были получены от больных животных в острый период при сильной паразитемии. Приготавливались мазки крови и отпечатки внутренних органов (печени, селезенки, головного мозга и легких). Они фиксировались в сухом виде метиловым спиртом или влажным способом жидкостью Шаудина и по Карнуа. Препараты окрашивались по Гимза-Романовскому и на нуклеиновые кислоты по Фельгену и по Унна (метиловый зеленый—пиронин). Для реакции Фельгена сухие мазки дополнительно обрабатывались в течение часа жидкостью Карнуа и затем тщательно отмывались в спиртах и воде. Гидролиз в соляной кислоте продолжался 7—8 мин. На белки производилась окраска по Мезия (Mazia, 1953) сулемой бромфеноловым синим. Некоторые мазки сначала окрашивались по Гимза-Романовскому, а затем по Фельгену. Одни и те же паразиты, таким образом, исследовались разными методами. Для работы был использован микроскоп Рейхерта «Цетопан» (об.  $100 \times 1.30$  и ок. 10 и 15).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**P. bigeminum** (рис. 1). При окраске по Гимза-Романовскому у грушевидных паразитов нередко выделяются два участка вишнево-красного цвета, лежащие на фоне голубой или фиолетовой цитоплазмы (рис. 1, а). Один участок, более или менее круглой формы, диаметром около 1 мк, располагается в расширенной части паразита. Другой участок, иногда менее интенсивно окрашенный, имеет также круглую форму с неправильными очертаниями и занимает середину грушевидного тела пироплазмы.

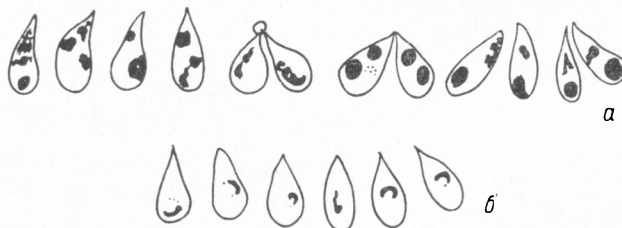


Рис. 1. *Piroplasma bigeminum*.

а — окраска по Гимза-Романовскому, б — окраска по Фельгену.

Заостренный конец грушевидных форм нередко окрашивается более интенсивно в фиолетовый цвет, чем расширенная часть тела. Два сильно окрашенных участка в терминальной части и в центре паразита не соединены друг с другом и представляют собой те самые два «хроматиновых» скопления, или два ядра, о которых пишут разные авторы. Менее постоянно встречается терминальное скопление материала, красящегося в красный цвет. Вероятно, именно это тельце представляет собой дополнительное ядро, или блефаропласт (Riek, 1964). На разных мазках от одного животного число таких «двуядерных» форм сильно варьирует. В одних случаях они встречаются часто, в других редко. По-видимому, это определяется не только состоянием самих паразитов, но и чисто методическими причинами, связанными с фиксацией и окраской.

При окраске по Фельгену у грушевидных форм выявляется одно ядро в центральной части тела или ближе к расширенной части (рис. 1, б). В ядре фельгенположительный материал располагается по периферии в виде небольшой серповидной полоски или в виде нескольких гранул, сближен-

ных друг с другом и соединенных тонкой перемычкой. Никакого дополнительного ядра, видимого при окраске по Гимза-Романовскому с помощью фельгеновской реакции, выявить не удалось. При окраске по Унна также выявляется одно ядро, которое окрашивается метиловым зеленым. В ядре не удалось выявить кариозомы, богатой РНК. Вся цитоплазма пиронинофильна и в особенности тот участок, который сильно красится по Гимза-Романовскому, как дополнительное ядро. При окраске сулемой + бром-феноловым синим выявляются часто два темно-синих скопления, из которых одно соответствует ядру, а другое — так называемому второму скоплению хроматина.

*P. canis*. При окраске по Гимза-Романовскому в грушевидных формах пироплазм из периферической крови в красный цвет большей частью окрашивается только один участок, лежащий ближе к центральной части паразита (рис. 2, а). Иногда наблюдаются два таких участка наподобие того, что видно у *P. bigeminum*. При окраске по Унна выявляется одно ядро. В зеленый цвет окрашивается небольшой серповидный участок ядра, или плотная гранула. Такая же картина наблюдается при окраске по Фельгену. Нередко скопление ДНК имеет вид небольших гранул, лежащих близко друг к другу. Вероятно, ядра с двумя фельгенположительными гранулами находятся в начальной стадии деления. Ни в одном случае не удалось наблюдать в одиночных грушевидных формах два фельгенположительных ядра (рис. 2, б).

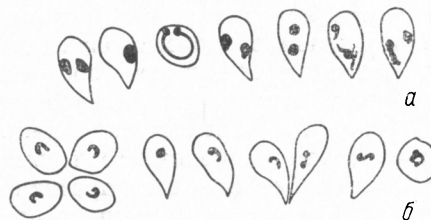


Рис. 2. *Piroplasma canis*.

а — окраска по Гимза-Романовскому,  
б — окраска по Фельгену.

Таким образом, из двух так называемых хроматиновых скоплений, окрашивающихся в красный цвет по Гимза-Романовскому, только одно, лежащее обычно ближе к центру грушевидного тельца, соответствует ядру, тогда как другое в расширенной части тела к ядру не имеет отношения, так как основной его компонент — ДНК — отсутствует в данном скоплении.

Кроме эритроцитарных форм *P. canis*, были исследованы паразиты из плазмы крови. Они также имели одно ядро. В различных клетках внутренних органов, как например в печени, легких, селезенке, никаких стадий развития пироплазм не было обнаружено. Я не могу подтвердить данные Колабского с сотрудниками (1961) о нахождении овальных и круглых пироплазм в эндотелиальных и печеночных клетках собак. Я имел материал тех же собак, которых исследовал Колабский, однако ничего похожего на пироплазм в клетках внутренних органов не было найдено. Те образования, которые Колабский принял за пироплазм, не имеют отношения к простейшим и, по всей вероятности, представляют собой посторонние тельца, появившиеся при обработке препарата.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Применение цитохимической методики для окраски нуклеиновых кислот позволило выявить у грушевидных форм *P. bigeminum* и *P. canis*, локализованных в эритроцитах, и у внеэритроцитарных форм одно ядро с периферическим расположением хроматина в виде серповидной полоски или в виде одной-двух гранул. При окраске по Гимза-Романовскому ядро всегда красится, как плотное тельце, причем, кроме хроматина, окрашивается и рибонуклеопротеид, локализованный в центре ядра. Ядро, окрашенное по Гимза-Романовскому, имеет всегда большие размеры, чем при окраске по Фельгену. Ядро эритроцитарных форм *P. bigeminum*

сходно с ядром булавовидных форм того же вида из гемоцеля клеща *Boophilus calcaratum*. У них при окраске по Фельгену в ядре было заметно периферическое распределение хроматина, тогда как по Гимза-Романовскому ядра окрашивались равномерно и выглядели, как плотные тельца (Хейсин и Муратов, 1959).

Таким образом, наши данные вполне подтверждают исследования Рея и Сенгупта, которые показали, что у пироплазм имеется только одно ядро в центре тела паразита с периферическим расположением хроматина. По мнению Рея, положительную реакцию Фельгена дает также и кариозома. Мне не удалось ее обнаружить. Вероятно, Рей принял отдельную гранулу в ядре, дающую положительную реакцию Фельгена за кариозому. Последняя всегда богата РНК.

Положение ядра в теле грушевидных особей непостоянно. По-видимому, это связано с какими-то циклическими изменениями, происходящими в пироплазмах, локализованных в крови позвоночных животных.

Что же представляет собой так называемое второе, или дополнительное ядро, лежащее часто в расширенной части тела грушевидных форм. Так как оно выявляется только при окраске по Гимза-Романовскому и по Мезия на белки, то весьма вероятно, что оно представляет собой скопление базофильных протеиновых веществ. Рей и Сенгупта, изучавшие *P. bigeminum* с помощью цитохимических методов, обнаружили, что в расширенной части грушевидных особей содержится материал, дающий положительную реакцию на РНК, гликоген и щелочную фосфатазу. По-видимому, именно этот комплекс веществ и окрашивается по Гимза-Романовскому в красный цвет и принимается за дополнительное ядро.

Пироплазмы обладают способностью к пиноцитозу (Rudzinska a. Traeger, 1962). Поэтому можно предположить, что в их цитоплазме имеются иногда разной величины пищеварительные вакуоли, содержащие строму эритроцита, втянутую паразитом. Хойт (Hoyle, 1966), изучавший с электронным микроскопом *P. bigeminum*, обнаружил в их цитоплазме от 1 до 4 пищеварительных вакуолей, достигающих диаметра до 900 мкм. Примерно  $\frac{1}{3}$  особей имела такие вакуоли. У других особей в цитоплазме имелись группы более мелких (до 200 мкм) вакуолей с плотным содержанием и мелкими гранулами. Хойт предполагает, что это пищеварительные вакуоли на разных стадиях переваривания. Вероятно, именно эти вакуоли, расположенные в основном в расширенной части грушевидных особей, окрашиваются в красный цвет по Гимза-Романовскому и поэтому они легко принимаются при исследовании в световой микроскоп за ядро. Возможно, что такие пищеварительные вакуоли обнаружил Рик (Riek, 1964) у того же вида пироплазм при исследовании в световой микроскоп, но принял их за «дополнительные ядра». Рик наблюдал выбрасывание из грушевидных особей таких «дополнительных ядер». Сопоставляя данные Хойта и Рика, можно думать, что последний автор видел не выбрасывание ядер, а выбрасывание содержимого пищеварительных вакуолей. Таким образом, Рик описал скорее всего акт дефекации, а не процесс выбрасывания «дополнительного ядра».

Таким образом, за дополнительное ядро могут быть приняты пищеварительные вакуоли и скопления гликогена, РНК и щелочной фосфатазы (Ray a. Sengupta, 1956). Применение окраски по Фельгену позволило выявить только одно ядро. Второго ядра, или блефаропласта, у пироплазм не обнаружено. Во всяком случае с электронным микроскопом не удалось выявить элементов кинетида (Bayer a. Dennig, 1961; Rudzinska a. Traeger, 1962; Simpson et al., 1963). Строение блефаропласта (правильнее говорить о кинетозоме!) весьма характерно, и поэтому вряд ли при исследовании пироплазм с электронным микроскопом эта органелла могла остаться незамеченной. Однако, опираясь на недостоверные факты о наличии у пироплазм «блефаропласта», Засухин (1965) делает попытку сблизить пироплазм с жгутиконосцами. Для такого вывода в настоящее время нет убедительных фактов.

## ВЫВОДЫ

С помощью реакции Фельгена и окраски по Унна изучены ядра *Piroplasma canis* и *P. bigeminum* из крови собак и крупного рогатого скота. Было установлено, что грушевидные формы этих паразитов имеют только одно ядро, содержащее небольшое скопление ДНК, в виде полулуния или серпа. Часто в ядре видна одна или две фельгенположительные гранулы. Указания различных авторов о наличии у пироплазм двух ядер, или ядра и блефаропласта, или двух «хроматиновых» скоплений не могут считаться правильными, так как они основаны лишь на данных, полученных при окраске по Гимза-Романовскому. Так называемое дополнительное ядро, блефаропласт или скопление «хроматина», не содержат ДНК, а представляют собой либо пищеварительную вакуоль, либо скопления РНК, гликогена и щелочной фосфатазы (Ray a. Sengupta, 1956) окрашивающиеся в красный цвет по Гимза-Романовскому.

## Литература

- Агринский Н. И. 1953. Методы лабораторных исследований патогенных простейших. В сб.: Лабораторные методы исследования в ветеринарии, 1. Сельхозгиз, М.
- Засухин Д. Н. 1965. Положение в системе типа Protozoa токсоплазм, пироплазм и некоторых других простейших. Зоол. журн., 44 (1) : 123—125.
- Коллабский Н. А., Гайдук А. Х. и Тарведян Т. Н. 1961. Некоторые данные о размножении пироплазм в организме животных. Сб. работ научн. конф. по протозоол. пробл., посвящ. 90-летию В. Л. Якимова : 41—51.
- Хейсин Е. М., Муратов Е. А. 1959. Исследование по цитологии булавовидных форм *Piroplasma bigeminum*. Цитология, 1 (1) : 127—132.
- Чеботарев Р. С. 1951. Пироплазмоз лошадей. Изд. АН УССР, Киев : 3—261.
- Якимов В. Л. 1931. Болезни домашних животных, вызываемые простейшими. Сельхозгиз, М.—Л. : 1—863.
- Bayer M., Dennig K. 1961. Elektronenoptische Untersuchungen an *Babesia canis*. Z. Tropenmed. Parasitol., 12 : 28—35.
- Christophers S. R. 1907. *Piroplasma canis* and its life cycle in the tick. Sci. Mem. Med. a. San. Dep. Gov. India, N. S., 29 : 1—83.
- Dennis E. W. 1932. The life-cycle of *Babesia bigemina* of Texas cattle fever in the tick *Margaropus annulatus* with notes on the embryology of *Margaropus*. Un. Calif. Publ. Zool., 36 : 263.
- Fantham H. B. 1907. The chromatin mass of *Piroplasma bigeminum*. Quart. J. Micr. Sci., 51 : 297—324.
- Нойте Н. М. 1966. Electron microscope studies of *Babesia bigemina* with particular reference to its mode of nutrition. Proc. 1 Intern. Congr. Parasitol. Roma, 1964, 1 : 261—262.
- Kinoshita K. 1907. Untersuchungen über *Babesia canis*. Arch. Protist, 8 : 294—320.
- Mazia D., Brewer P. a. Alferf M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. Biol. Bull., 104 : 57.
- Neveu-Lemaire A. 1943. Traité de Protozoologie. Paris.
- Nicolle C. 1907. Sur une piroplasmose nouvelle d'un rongeur. C. R. Soc. Biol., 63 : 213—216.
- Nuttall G. H. a. Graham-Smith G. S. 1905. Canine piroplasmosis. II. J. Hyg., 5 : 237—249.
- Poisson R. 1953. Sporozoaires incertains. Superfamille des Babesioidea. In Traité de Zoologie, edit. P. Grassé. 1. fasc. 2 : 935—975.
- Rfa y H. 1938. On the nuclear structure of *Babesia bigemina*. Ind. J. Vet. Sci. a. Anim. Husb., 8 : 183—186.
- Ray H. a. Sengupta P. C. 1956. Localisation of alkaline phosphatase in *Babesia bigemina*. Bull. Cal. S. T. M., 4 (2) : 77.
- Riek R. F. 1964. The life Cycle of *Babesia bigemina* in the tick vector *Boophilus microplus*. Austr. J. Agric. Res., 15 : 802—821.
- Rudzinska M. a. Trager W. 1962. Intracellular phagotrophy in *Babesia rodhaini* as revealed by electron microscopy. J. Protozool., 9 (2) : 179.
- Simpson C. F., Bild C. E. a. Stöliker H. E. 1963. Electron microscopy of canine and equine *Babesia*. Amer. J. Vet. Res., 24 : 408—410.



CERTAIN DATA ON THE STRUCTURE OF PIROPLASMA  
BIGEMINUM AND PIROPLASMA CANIS

E. M. Kheisin

S U M M A R Y

Studies of nuclei from blood of dogs and cattle were carried out by means of Feulgen's reaction and staining according to Unna. It has been established that pyriform individuals have only one nucleus, which contain a small accumulation of DNA (in the shape of half-moon or crescent). Often one or two feulgenpositive granules are visible in nucleus. Considerations of various authors concerning the presence of two nuclei in *Piroplasma* or one nucleus and blepharoplast or two «chromatin» accumulations are not true since they are based only on results obtained by staining according to Giemsa-Romanovsky. The so-called additional nucleus, blepharoplast or «chromatin accumulation» do not contain DNA. They involve either a digestive vacuole or accumulation of RNA, glycogen and alkaline phosphatases (Ray a. Sengupta, 1956) which are red stainable according Giemsa-Romanovsky.

---