

СВЕТООПТИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦИСТНЫХ СТАДИЙ SARCOCYSTIS FUSIFORMIS ИЗ БУЙВОЛА

А. И. Радченко, Г. Д. Гаибова

Описаны три типа клеток в саркоцисте *Sarcocystis fusiformis*: метроциты, промежуточные клетки и мерозонты. Метроциты располагаются по периферии цисты, опоясывая цистную стенку изнутри. Другие два типа клеток — промежуточные и мерозонты — лежат ближе к центру и объединяются в группы, которые отделены друг от друга септами. Мерозонты — неделимые клетки по своим потенциям являются предгамонтами. Наличие в саркоцисте трех типов клеток подтверждается предварительными цитофотометрическими исследованиями.

Со времени описания саркоспоридий в мышцах буйволов (Railliet, 1897, по: Dissanaïke, Kan, 1978) появилось много работ, посвященных жизненному циклу, морфологии, ультраструктуре и биохимии этих паразитов. К настоящему времени выяснено, что у буйволов паразитируют два вида *Sarcocystis*: *S. fusiformis* и *S. levinei* (Levine, Tadros, 1980; Tadros, Laarman, 1982). Половая фаза цикла развития и образование ооцист *S. fusiformis* совершаются в кишечнике кошки (Dissanaïke e. a., 1977; Tongson, Pablo, 1979). При съедании буйволом таких ооцист в его организме проходит бесполой фаза цикла развития, заключительным моментом которой является образование мышечных цист (саркоцист). Таким образом, буйвол является промежуточным хозяином *S. fusiformis*. Цисты этого вида имеют размер от 500 мкм и более. Саркоцисты, обладающие такими размерами в зрелом состоянии, были названы макроцистами, в отличие от мышечных цист тех саркоспоридий, которые образуют микроцисты с размерами менее 500 мкм. Вид, образующий микроцисты в мышечной ткани буйволов, был назван *S. levinei*. Половая фаза цикла развития этого паразита протекает в кишечнике собаки (Dissanaïke e. a., 1977; Dissanaïke, Kan, 1978; Ghoshal e. a., 1986; Jain, Shah, 1986).

В данной работе представлено исследование одного из этапов бесполой фазы цикла развития *S. fusiformis* в организме промежуточного хозяина (буйвола), а именно, цистной мерогонии. Половая фаза цикла развития этого паразита совершается в кишечнике кошки, что было показано в специальных экспериментах (Мусаев и др., 1987).

М а т е р и а л и м е т о д и к а. Зараженные макроцистами *Sarcocystis* мышцы буйвола получали на мясокомбинате г. Баку. Для светомикроскопического изучения кусочки мышц фиксировали жидкостью Карнуа и заливали в парафин. Морфологию цист изучали на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином-эозином по Эрлиху. Измерения цистозоитов проводили на мазках, фиксированных метанолом и окрашенных по Романовскому—Гимза. Для приготовления мазков цисты извлекали из кусочков мышц и механически разрушали в физиологическом растворе на 0.1 М фосфатном буфере. Для электронной микроскопии извлеченные из мышц саркоцисты фиксировали 3%-ным глутаральдегидом на 0.1 М какодилатном буфере с последующей фиксацией в 1%-ном OsO₄ на том же буфере. Материал заключали в аралдит—эпон по общепринятой методике. Ультратонкие срезы окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Срезы просматривали на электронном микроскопе Tesla-500.

Р е з у л ь т а т ы. Мышечные цисты, полученные от спонтанно зараженных буйволов, достигали 1—7 мм. Цистная стенка ограничивает основное вещество цисты, в котором расположены цистозоиты или цистные стадии развития паразита. Средний размер цистозоитов *S. fusiformis* составляет 15.8×4.7 мкм. Четко выделяется слой клеток, опоясывающий изнутри цистную стенку. Это — метроциты — малодифференцированные клетки, объединенные в группы по 2—4 и более. Под слоем метроцитов располагаются большие группы клеток, отделенные друг от друга септами (рис. 1, а; см. вкл.). Центральная область саркоцисты продвинутого возраста выглядит обычно пустой (рис. 1, б).

Электронно-микроскопическое исследование показало, что цистная стенка построена из мембраны и подлежащего осмиофильного слоя. Мембрана цистной стенки образует многочисленные, пронизанные фибриллами выросты. На всем протяжении цистной стенки прослеживаются электронноплотные пузырьки диаметром около 100 нм. Непосредственно под цистной стенкой располагается основное вещество цисты, образованное фибриллярно — гранулярным материалом (рис. 1, в, г).

Метроциты, расположенные по периферии цисты, имеют неправильную округлую форму, их пелликула образует многочисленные инвагинации. Они имеют более или менее центрально расположенное ядро пузырьковидного типа с субмембранным ядрышком (рис. 1, *d, e*). Конденсированный хроматин представлен в основном в виде гранул, а иногда в виде отдельных глыбок. Цитоплазма метроцитов заполнена многочисленными зернами амилопектина и разнообразными вакуолями. Роптрии и микронемы у метроцитов не обнаруживаются. В центральной области цисты выделяются еще два типа клеток: промежуточные и мерозонты. Овальные промежуточные клетки окружены трехмембранной пелликулой, в их цитоплазме отчетливо видны роптрии, микронемы, коноид. Делятся эти клетки путем эндодиогении, при этом внутри материнской клетки образуются две дочерние (рис. 2, *a*; см. вкл.). Большинство клеток в зрелых цистах составляют банановидные мерозонты, окруженные трехмембранной пелликулой (рис. 2, *b, в*). В мерозонтах отчетливо видны апикальные органеллы, такие как коноид, полярное кольцо и отходящие от него субпелликулярные микротрубочки, роптрии, микронемы (рис. 2, *б—г*). В ядрах мерозонтов конденсированный хроматин представлен в виде крупных глыбок размером 0.2—0.8 мкм и гранул от 20 до 50 нм. В цитоплазме мерозонтов разбросаны многочисленные амилопектиновые гранулы (рис. 2, *б*).

Обсуждени е. Размеры и форма саркоцист и цистозитов *S. fusiformis* из буйвола в нашем исследовании не отличались от таковых, описанных в литературе (Levine, 1977). Особенность мышечных цист *S. fusiformis* состоит в том, что внутри цисты четко разграничиваются разные цистные стадии. Метроциты опоясывают цистную стенку изнутри, а отдельные группы клеток, расположенные под слоем метроцитов и отделенные друг от друга септами, представлены промежуточными клетками и мерозонтами.

На нашем материале, также как и у других исследователей (Kan, Dissanaikе, 1977; Ghaffar e. a., 1978), стенка макроцист *S. fusiformis* независимо от их размера имела сходное строение, при этом выросты цистной стенки напоминали таковые *S. ovifelis*. Однако существенное различие в строении цистной стенки этих видов состоит в том, что у *S. ovifelis* имеется вторичная цистная стенка, образованная соединительной тканью и коллагеновыми волокнами (Mehlhorn e. a., 1978; Казакаускайте, 1982). Выросты стенки цисты *S. fusiformis* содержат большое количество фибрилл. Такое строение цистной стенки может свидетельствовать о способности цисты к изменению формы в соответствии с движением мышц зараженного хозяина. Осмиофильное вещество, подстилающее мембрану саркоцисты изнутри, вероятно, укрепляет цистную стенку.

Три стадии развития клеток (метроциты, промежуточные и мерозонты) были обнаружены как в мышечных цистах *S. fusiformis*, так и *S. muris*, *S. ovifelis* (Федосеевко, Левит, 1979; Казакаускайте, 1980; Бейер и др., 1981; Радченко, 1986). При этом метроциты представляют собой малодифференцированные клетки, окруженные трехмембранной пелликулой. Поскольку мы имели дело со спонтанно зараженным материалом, точно установить возраст цист не представлялось возможным, но тем не менее наши исследования были проведены на зрелых и старых цистах *S. fusiformis*. В этих цистах деления метроцитов мы не обнаружили, но отметили определенный процесс одностороннего развития в сторону более дифференцированной стадии — мерозонтов.

Процесс деления метроцитов был прослежен в молодых цистах у *S. dirumpens* (Häfner, Frank, 1986). Деление этих метроцитов проходит по типу эндополигении, подобно тому как этот процесс совершается в печени мышей в случае заражения *S. dispersa* (Sénaud, Černá, 1978). Однако способность к делению путем эндополигении могли приобрести только метроциты, обладающие полигеномными ядрами, способные давать начало уже не метроцитам, а промежуточным клеткам, имеющим все органеллы апикального комплекса (коноид, полярное кольцо с субпелликулярными микротрубочками, роптрии, микронемы, плотные гранулы).

Промежуточные клетки у *S. fusiformis*, так же как и у других видов *Sarcocystis*, делятся путем эндодиогении с образованием двух дочерних клеток внутри материнской. В результате их деления в саркоцисте появляется третий тип клеток — мерозонты. Мерозонты в цисте не делятся, по своей потенции они являются гамонтами, последующее развитие которых осуществляется в организме окончательного хозяина. Эти клетки имеют типичное строение, характерное для зоитов *Apicomplexa*.

На рис. 2, *в, г* видно, что полярное кольцо в своей основе представляет мембранную структуру, от которой отходят многочисленные фибриллы, дающие начало субпелликулярным микротрубочкам. Подробное описание становления полярного кольца зоитов на примере *S. muris* дано в предыдущей работе (Радченко, 1987).

Центральная зона саркоцист значительно продвинутого возраста выглядит обычно пустой. Это

явление мы связываем с тем, что в процессе роста цисты происходит отмирание и утилизация старых мерозоитов.

Обнаружение нами в мышечных цистах *S. fusiformis* трех типов клеток на морфологическом уровне подтверждается также результатами предварительного цитофотометрического исследования (Гаибова, 1987). Было показано, что в ядрах подавляющего большинства клеток зрелых саркоцист количество ДНК соответствует 1 с. Согласно морфологическим картинам эту часть клеток составляют мерозоиты. Кроме того, были выявлены клетки с повышенным содержанием ДНК вплоть до двойного (2 с). Мы склонны считать, что клетки с повышенным содержанием ДНК относятся к дифференцирующимся метроцитам, а клетки с двойным содержанием ДНК — к промежуточным. На основании проведенных исследований мы приходим к выводу о реальном существовании трех типов клеток в саркоцистах *S. fusiformis* в дополнение к *S. muris* и *S. ovisfelis*. Можно предположить, что эта особенность характерна для всего рода *Sarcocystis*, учитывая значительное сходство жизненных циклов составляющих его видов.

Л и т е р а т у р а

- (Бейер Т. В., Грикене не Я. С., Сидоренко Н. В.) Beyer T. V., Grikenene J. S., Sidorenko N. V. *Sarcocystis ovisfelis* (Eimeriidae, Sporozoa, Apicomplexa): Modes of asexual reproduction in the cyst stages // *Progress in Parasitol.*, Abst., IV Int. Congr. protozool. Warszawa, 1981. P. 27.
- Мусаев М. А., Суркова А. М., Гаибова Г. Д. Выделение неспорулированных спороцист саркоспоридий при экспериментальном саркоспориidioзе // *Современные проблемы протозоологии*. Матер. Всесоюз. съезда ВОПР. Л.: Наука, 1987. С. 147.
- Гаибова Г. Д. Выявление нуклеиновых кислот в цистных стадиях *Sarcocystis fusiformis* (Apicomplexa, Sporozoa) // *Современные проблемы протозоологии*. Матер. 4-го Всесоюз. съезда ВОПР. Л.: Наука, 1987. С. 194.
- Казакаускайте Я. С., Сидоренко Н. В. Электронно-микроскопическое изучение цисты саркоспоридии *Sarcocystis ovisfelis* // *Цитология*. 1980. Т. 22, № 10. С. 1163—1174.
- Казакаускайте Я. С. Ультраструктура цистных стадий *Sarcocystis ovisfelis* Heydorn e. a., 1975 // *Кишечные простейшие*. Вильнюс, 1982. С. 62—65.
- Радченко А. И. Светооптическое и электронно-микроскопическое исследование цистообразующей кокцидии *Sarcocystis muris* // *Цитология*. 1986. Т. 28, № 11. С. 1165—1171.
- Радченко А. И. Электронно-микроскопическое изучение процесса деления промежуточных клеток в цисте *Sarcocystis muris* // *Цитология*. 1987. Т. 29, № 4. С. 404—409.
- Федосеев В. М., Левит А. В. Электронно-микроскопическое изучение цист *Sarcocystis muris* в скелетной мускулатуре белых мышей // *Токсоплазмиды*. Л.: Наука, 1979. С. 106—110.
- Dissanaike A. S., Kan S. P. Studies of *Sarcocystis* in Malaysia. I. *Sarcocystis levinei* n. sp. from the water buffalo (*Bubalus bubalis*) // *Z. Parasitenk.* 1978. Bd 55. S. 127—138.
- Dissanaike A. S., Kan S. P., Retnasabapathy A., Baskazan G. Demonstration of the sexual phases of *Sarcocystis fusiformis* (Railliet, 1897) and *Sarcocystis* sp. of water buffalo (*Bubalus bubalis*) in the small intestines of cats and dogs // *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hygiene*. 1977. Vol. 71, N 3. P. 271.
- Ghaffar F. A., Hilali M., Scholtyssek E. Ultrastructural study of *Sarcocystis fusiformis* (Railliet, 1897) infecting the Indian water buffalo (*Bubalus bubalis*) of Egypt // *Tropenmed. Parasitol.* 1978. Vol. 29, N 3. P. 289—294.
- Ghoshal S. B., Joshi S. C., Shah H. L. A note on the natural occurrence of *Sarcocystis* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Jabalpur region, M. P. // *Ind. Vet. J.* 1986, N 63. P. 165—166.
- Häfner U., Franck W. Morphological studies on the muscle cysts of *Sarcocystis dirimpens* (Hoar, 1933) Häfner and Matuschka, 1984 in several host species revealing endopolygeny in metrocytes // *Z. Parasitenk.* 1986. Bd 72. S. 453—461.
- Jain P. C., Shah H. L. Experimental study on gametogonic development of *Sarcocystis levinei* in the small intestine of dogs // *Ind. Animal Sci.* 1986. Vol. 56, N 3. P. 314—318.
- Kan S. P., Dissanaike A. S. Studies of *Sarcocystis* in Malasia. II Comparative ultrastructure of the cyst wall and zoites of *Sarcocystis levinei* and *S. fusiformis* from the water buffalo (*Bubalus bubalis*) // *Z. Parasitenk.* 1977. Bd. 57. S. 106—116.
- Levine N. D. Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat // *J. Parasitol.* 1977. N 63. P. 36—54.
- Levine N. D., Tadros W. Named special and hosts of *Sarcocystis* (Protozoa: Apicomplexa, Sarcocystidae) // *Syst. Parasitol.* 1980. Vol. 2. P. 41—59.
- Mehlhorn H., Hartley W. J., Heydorn A. O. A comparative ultrastructural study of the cyst wall of 13 *Sarcocystis* species // *Protistologica*. 1978. N 3. P. 451—467.
- Sénauud J., Černá Z. Le cycle de développement asexuée de *Sarcocystis dispersa* (Černá, Kolarova et Sulc, 1977) chez la souris: étude au microscope électronique // *Protistologica*. 1978. T. 14, N 2. P. 155—176.

- T a d r o s W., L a a r m a n J. J. Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia // *Advances of Parasitology*. Vol. 20. London, 1982. P. 293—468.
- T o n g s o n M. S., P a b l o L. S. M. Preliminary screening of possible definitive hosts of *Sarcocystis* species in Philippine buffaloes (*Bubalus bubalis*) // *Phillippine J. Vet. Med.* 1979. Vol. 18. P. 42—54.

Институт цитологии АН СССР,
Ленинград;
Институт зоологии АН АзССР,
Баку

Поступила 12.12.1986

CYSTIC STAGES OF SARCOCYSTIS FUSIFORMIS (SPOROZOA, APICOMPLEXA)
FROM THE WATER BUFFALO AS REVEALED
BY LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY

A. I. Radchenko, G. D. Gaibova

S U M M A R Y

Three different cell types are distinguished in the sarcocysts of *Sarcocystis fusiformis* from the water buffalo: metrocytes, intermediate cells, and merozoites. The former lines the cyst near the border, the two latter lie more inside forming groups of cells separated from each other by septae. The pattern of metrocyte division giving rise to another metrocyte population has not been observed, still remaining obscure. Merozoites do not divide asexually due to their gamont nature to be realized in the final host only. The intermediate cells divide asexually by endodyogeny giving rise, on the one hand, to another population of intermediate cells, and on the other — to merozoites which divide no longer. Cytophotometrical measurements (Gaibova, 1987) revealed the amounts of DNA per cell nucleus within 1 and 2 c. This quantity corresponds to the stable DNA content in the most numerous population of merozoites (gamonts), whereas the amount between those higher than 1 c and 2 c may be attributed to the nuclei of metrocytes and intermediate cells, respectively.

Вклейка к ст. А. И. Радченко и др.

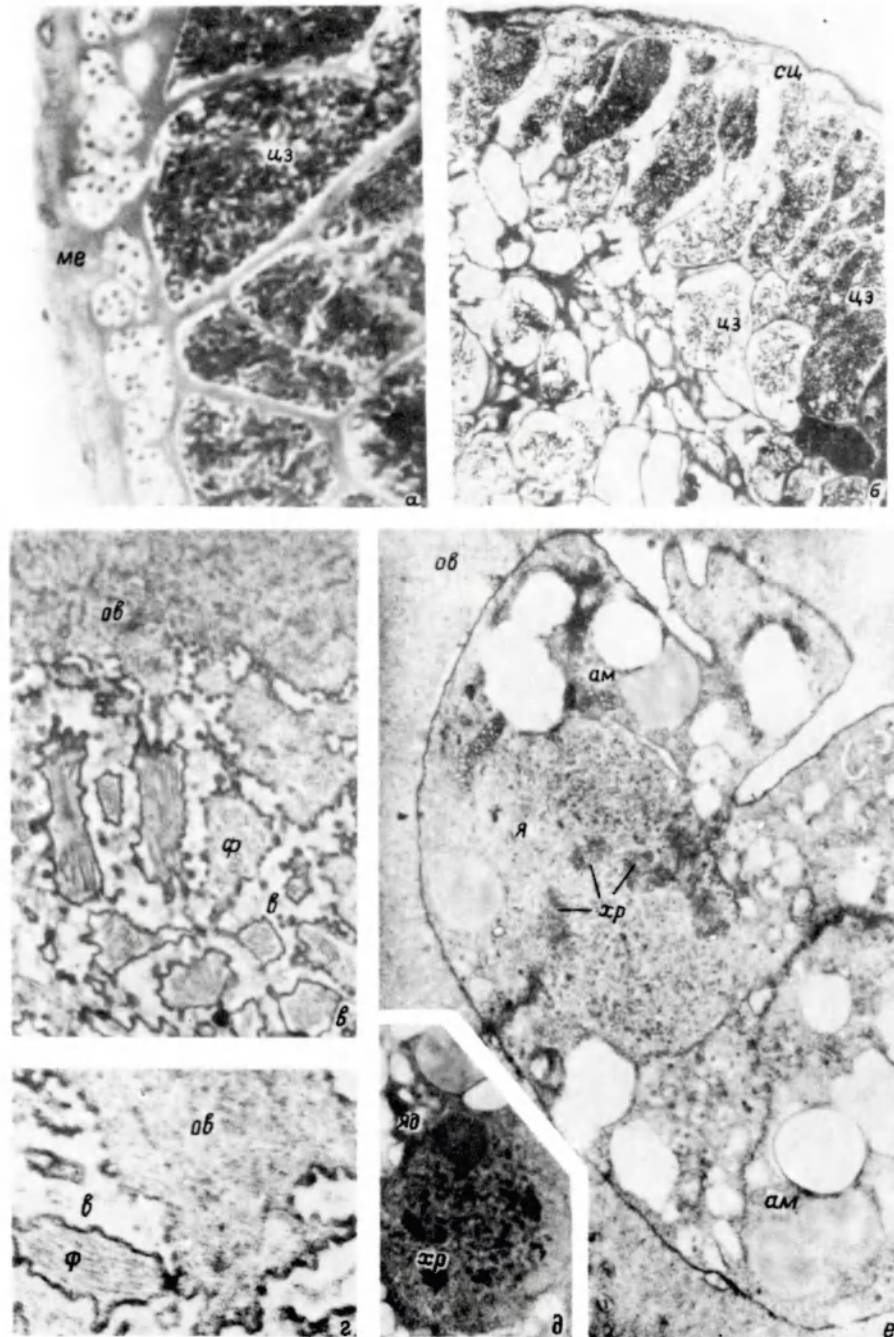


Рис. 1. Особенности строения цисты *Sarcocystis fusiformis*.

a, б — морфология цисты на светооптическом уровне; *в, г* — ультраструктура стенки цисты; *a* — ув. 3.2×100 , *б* — ув. 3.2×40 , *в* — ув. 36 050, *г* — ув. 34 500; *д* — ультраструктура меронита; *е* — ультратонкое строение ядра цистозитов, *д* — ув. 18 500, *е* — ув. 24 400; *ам* — амилопектин; *в* — выросты стенки цисты; *ме* — мерониты; *об* — основное вещество цисты; *сц* — стенка цисты; *ф* — фибриллы; *хр* — хроматин; *цз* — цистозиты; *я* — ядро; *яд* — ядрышко.

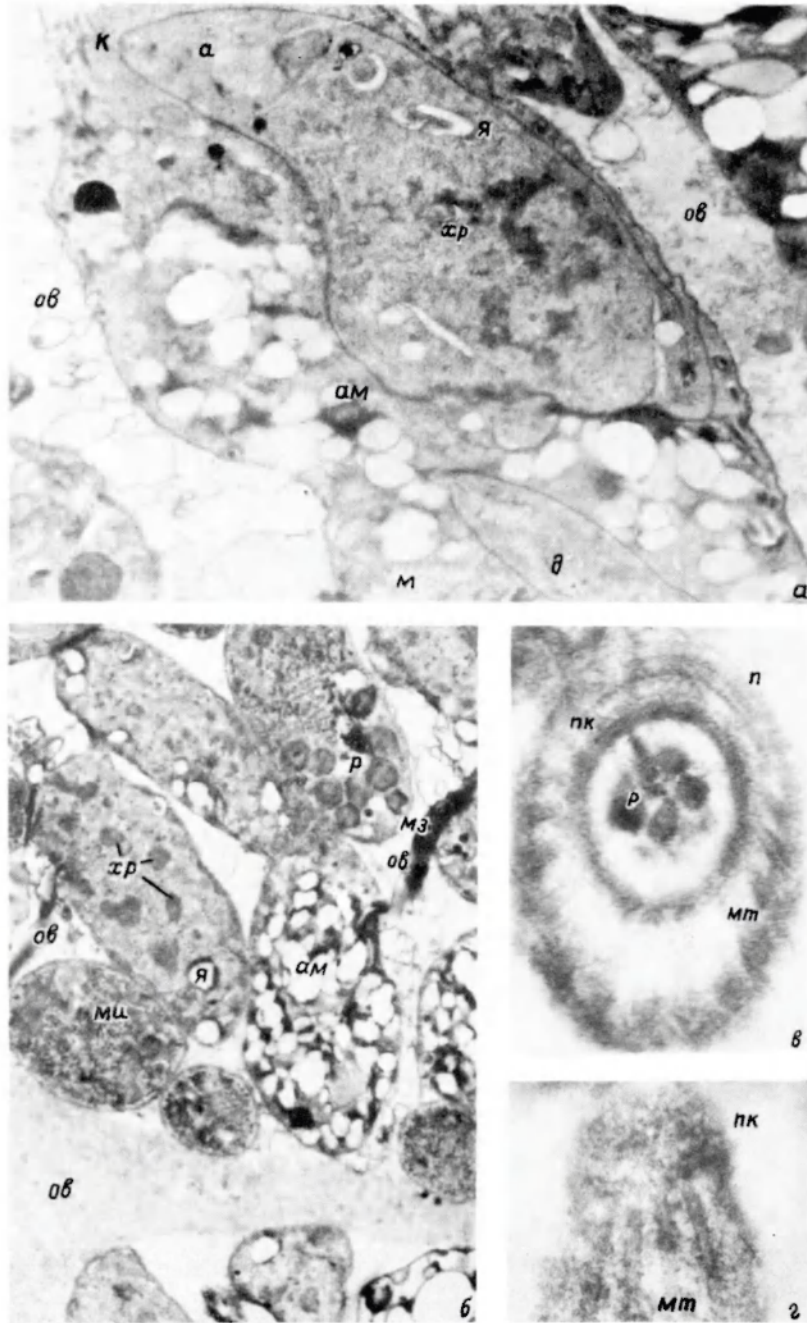


Рис. 2. Ультраструктура зоитов в цисте *Sarcocystis fusiformis*.

а — делящаяся промежуточная клетка; б — центральный участок цисты, заполненный мерозонтами; в, г — строение апикального конца мерозонтов; а — ув. 18 800, б — ув. 8100, в — ув. 97 020, г — ув. 80 200; д — дочерние клетки; к — коноид; м — материнская клетка; мз — мерозонты; ми — микрономы; мт — микротрубочки; п — пелликула; пк — полярное кольцо; р — роптрии.
Остальные обозначения те же, что на рис. 1.