

УДК 576.893.19 : 598.8

© 1993

**ГАМЕТОГЕНЕЗ, ФОРМИРОВАНИЕ ЗИГОТЫ И ООКИНЕТЫ
У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ГЕМОПРОТЕИД
(НАМОСПОРИДИА: НАМОПРОТЕИДАЕ) ПТИЦ IN VITRO****Г. А. Валькюнас, Т. А. Ежова**

Дана сравнительная характеристика гаметогенеза, формирования зиготы и оокинеты у *Haemoproteus tartakovskyi*, *H. belopolskyi*, *H. fringillae*, *H. pallidus* на светооптическом уровне in vitro и выделены наиболее ценные признаки, которые могут быть использованы в систематике этих одноклеточных животных.

Общая схема и последовательность гаметогенеза, формирования зиготы и оокинеты у гемоспоридий (Sporozoa: Haemosporidia) на светооптическом уровне хорошо изучены in vivo и in vitro (Garnham, 1966; Coatney e. a., 1971; Fallis, Desser, 1974, 1977; Carter, Diggs, 1977; Seed, Manwell, 1977; Killick-Kendrick, Peters, 1978). Вместе с тем видовые особенности этого процесса и детали морфологии соответствующих стадий развития изучены плохо и не используются при видовой характеристике даже у таких относительно хорошо изученных простейших, какими являются малярийные паразиты (Plasmodiidae) птиц, грызунов и приматов (Garnham, 1966; Coatney e. a., 1971; Seed, Manwell, 1977; Killick-Kendrick, Peters, 1978). Процесс онтогенеза оокинеты *Plasmodium berghei* Vincke et Lips, 1948 — одного из модельных видов при изучении малярии, подробно изучен лишь недавно (Rastogi e. a., 1989).

Видовая дифференциация гемопротеид (Haemoproteidae) птиц в настоящее время проводится, главным образом, на основе строения гаметоцитов и особенностей их воздействия на клетку-хозяина в периферической крови. При этом учитываются экспериментальные данные о специфичности паразитов. Сведения о других стадиях развития гемопротеид фрагментарны, не стандартизированы и в настоящее время не могут использоваться при определении этих простейших.

Список видов гемопротеид птиц постоянно расширяется и в настоящее время включает более 80 видовых названий, валидность которых не вызывает серьезных возражений. Примерно такое же число видовых названий используется для обозначения похожих паразитов, видовой статус которых требует подтверждения. В этой связи необходим поиск дополнительных признаков, которые можно использовать при видовой дифференциации. Одно из основных требований к новым диагностическим признакам — доступность изучения у многих видов в стандартных условиях. Лишь в этом случае возможно сравнение тех или иных стадий развития у многих видов гемопротеид, большинство из которых развивается у диких, в том числе экзотических, труднодоступных для лабораторного содержания видов птиц. У гемоспоридий к группе таких признаков можно отнести особенности гаметогенеза, формирование зиготы и оокинеты. Этот процесс легко индуцируется in vitro и может быть детально изучен в стандартных условиях.

Т а б л и ц а 1

Гаметогенез, формирование зиготы и оокинеты у 4 видов гемопротеид (Haemoproteidae) in vitro

Gametogenesis, zygote and ookinete formation of four species of haemoproteids (Haemoproteidae) in vitro

Стадия развития	Время после экспозиции крови, содержащей зрелые гаметоциты, на воздухе																										
	се- кун- ды	минуты												часы													
		30	1	2	4	5	6	8	10	15	20	30	35	45	1	1.5	2	3	4	6	8	9	12	24	36	48	60
Гаметоциты округляются, 2, 6-7	-	■	■	■		■		■	■		■		■	■	■	■	-		-	-							
	-	▲	▲	▲		▲	▲	▲	▲		▲		▲	▲	▲	▲	-					▲	▲	▲	-	-	
	◆	◆	◆	◆	●			●		●		●		●		●	●										
Гаметоциты покидают эритроциты, 3	-	-	■	■		■		■	■		■		■	■	■	-											
	-	-	▲	▲		▲	▲	▲	▲		▲		▲	▲	▲	-						▲	▲	-	-	-	
	◆	◆	◆	◆	●			●		●		●		●		●	●										
Макрогаметы, 4	-	-	■	■		■		■	■		■		■	■	■	■	■		■	■							
	-	-	▲	▲		▲	▲	▲	▲		▲		▲	▲	▲	▲	▲	▲		▲	▲		▲	▲	▲	-	-
	◆	◆	◆	◆	●			●		●		●		●		●	●			●	●						
Эксфлагелляция, 9	-	-	-	■		■		■	■		■		■	■	■	-											
	-	-	-	▲		▲	▲	▲																			
	-	◆	◆	◆	●			●		●		●		●		●											
Микрогаметы, 10	-	-	-	■		■		■	■		■		■	■	■	■	■		■	■							
	-	-	-	▲		▲	▲	▲	▲		▲		▲	▲	▲	▲	▲	▲		▲	▲		▲	▲	-	-	-
	-	◆	◆	◆	●			●		●		●		●		●	●			●	●		●	●			

В литературе имеются сведения о гаметогенезе и (или) формировании оокинеты у *Haemoproteus columbae* Kruse, 1890; *H. masoni* Castellani et Chalmers, 1910 (= *H. canachites* Fallis et Bennett, 1960); *H. tinnunculi* Wasielewski et Wülker, 1918; *H. lophortyx* O'Roke, 1929; *H. velans* Coatney et Roudabush, 1937; *H. palumbis* Baker, 1966 и некоторых других видов (Kruse, 1890; Wasielewski, Wülker, 1918; Wenyon, 1926; O'Roke, 1930; Mohammed, 1958; Fallis, Bennett, 1960; Baker, 1963, 1966; Garnham, 1966; Khan, Fallis, 1971; Dessler, 1972). Однако детальное сравнение этого процесса у разных видов гемопротеид для выявления признаков, имеющих диагностическое значение, ранее не проводилось.

Цель настоящей работы — дать возможно более подробное описание процесса гаметогенеза, оплодотворения, формирования зиготы и оокинеты у 4 видов гемопротеид птиц на светооптическом уровне в стандартных условиях *in vitro* и на этой основе выделить наиболее ценные признаки, которые могут быть использованы в систематике.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал собран на Биологической станции Зоологического института Академии наук России на Куршской косе Балтийского моря в мае 1990—1991 гг. Птиц отлавливали стационарными ловушками Рыбачинского типа, кольцевали, брали у них кровь и отсаживали в специальные садки. Мазки крови высушивали на воздухе, фиксировали метанолом, окрашивали азур-эозином по Романовскому и микроскопировали. Самцы соответствующих видов птиц, в крови которых регистрировалась чистая инвазия соответствующими видами гемопротеид, использовались в дальнейших исследованиях. Среди них 1 зяблик (*Fringilla coelebs* L.), зараженный *Haemoproteus fringillae* Labbé, 1894; 2 клеста-еловика (*Loxia curvirostra* L.), зараженных *H. tartakovskyi* Valkiūnas, 1989; 2 зеленые пересмешки [*Hippolais icterina* (Vieill)], зараженные *H. belopolskyi* Valkiūnas, 1989; 1 мухоловка-пеструшка [*Ficedula hypoleuca* (Pall.)], зараженная *H. pallidus* Valkiūnas et Iezhova, 1991. Интенсивность заражения птиц, которые были использованы в эксперименте, по определению скорости гаметогенеза, формирования зиготы и оокинеты *in vitro* составляла 3 гаметоцита на 1000 эритроцитов (95%-ный доверительный интервал 1÷7) у зяблика, 31 (20÷42) у клеста-еловика, 18 (11÷27) у зеленой пересмешки, 7 (3÷13) у мухоловки-пеструшки.

Кровь зараженных птиц брали из сердца, быстро помещали на часовое стекло и разводили 3.7%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 1 часть раствора на 4 части крови. Через определенные промежутки времени после экспозиции крови на воздухе (табл. 1) готовили мазки. Их высушивали на воздухе, фиксировали метанолом, окрашивали азур-эозином по Романовскому и микроскопировали. Для предотвращения быстрого высыхания раствора с кровью часовое стекло помещали в чашку Петри, на дно которой клали смоченный в дистиллированной воде лист фильтровальной бумаги. Работа выполнена в условиях лаборатории, где температура воздуха поддерживалась на уровне 18—20°.

Коллекционные препараты со всеми описанными в данной статье стадиями развития гемопротеид хранятся в Институте экологии, г. Вильнюс (Литва).¹

¹ Выражаем глубокую признательность директору Биологической станции ЗИНа АН России д-ру А. В. Бардину за предоставленную прекрасную возможность проведения исследований на станции, а также всем сотрудникам станции за помощь при отлове, определении птиц и консультации по орнитологии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Процесс гаметогенеза, оплодотворения, формирования зиготы и оокинеты у *Haemoproteus tartakovskyi*, *H. belopolskyi*, *H. fringillae*, *H. pallidus* in vitro проходит по единой схеме (рис. 1—4). А именно: зрелые гаметоциты укорачиваются, округляются и покидают зараженный эритроцит. При этом скорее всего целостность оболочки эритроцита сохраняется, так как большого числа свободных ядер и обломков эритроцитов в препаратах наблюдать не удается. Каждый освободившийся из клетки-хозяина макрогаметоцит без каких-либо видимых под световым микроскопом преобразований трансформируется в макрогамету, а микрогаметоцит — претерпевает эксфлагелляцию, в результате которой формируется крупное остаточное тело и змеевидные микрогаметы. Число последних варьирует от 4 до 8, но обычно равно 8. Сразу после появления микрогамет отмечается оплодотворение макрогамет и формируется зигота, которая через определенное время трансформируется в удлиненную оокинету. Развитие оокинеты включает стадию формирования остаточного тела, которое отделяется от оокинеты и содержит часть цитоплазмы и все пигментные гранулы или большую их часть.

Все эти превращения составляют важную часть жизненного цикла гемоспоридий и у всех 4 изученных видов in vitro проходят по единой схеме. Детальный анализ процесса гаметогенеза, формирования зиготы и оокинеты позволил выявить ряд видовых отличительных особенностей, которые условно можно разделить на 2 основные группы — морфологические признаки и особенности, связанные со временем формирования тех или иных стадий. Рассмотрим эти две группы признаков подробнее.

ВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В МОРФОЛОГИИ НЕКОТОРЫХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ГЕМОПРОТЕИД IN VITRO

По характеру воздействия округлившихся гаметоцитов на зараженный эритроцит изученные виды можно разделить на 2 группы. В момент освобождения из клетки-хозяина гаметоциты *Haemoproteus tartakovskyi*, *H. belopolskyi*, *H. fringillae* сильно воздействуют на эритроцит и его ядра. Эритроциты обычно округляются, а их ядро смещается на периферию (рис. 1, 3, 7; 2, 7; 3, 7). Такое воздействие на клетку-хозяина не отмечено у *H. pallidus* (рис. 4, 3, 7). Установлено, что воздействие на зараженный эритроцит прямо пропорционально размерам округлившихся гаметоцитов. В случае крупных гаметоцитов *H. tartakovskyi* воздействие на клетку-хозяина максимально выражено (рис. 1, 3, 7), маленькие округлившиеся гаметоциты *H. pallidus* покидают морфологически неизмененные эритроциты (рис. 4, 3, 7), а гаметоциты *H. belopolskyi* и *H. fringillae* по характеру воздействия на зараженный эритроцит занимают промежуточное положение между *H. tartakovskyi* и *H. pallidus* (рис. 2, 7; 3, 3, 7).

Освободившиеся из эритроцитов гаметоциты представляют собой округлые тела, в которых хорошо различимо ядро и гранулы пигмента. Их строение идентично у всех изученных видов гемопротеид.

Интересно отметить, что размеры макрогамет у всех изученных видов практически совпадают (табл. 2). Вместе с тем размеры зрелых гаметоцитов в периферической крови птиц у некоторых видов, например у *H. belopolskyi* и *H. pallidus* (рис. 2, 1, 5; 4, 1, 5), достоверно отличаются по этому признаку ($P < 0.01$). Таким образом, на стадии, предшествующей оплодотворению, скорее всего, имеет место выравнивание размеров макрогамет.

Сразу после освобождения из эритроцитов у микрогаметоцитов всех видов отмечается эксфлагелляция (рис. 1, 9; 2, 10; 3, 9; 4, 9). На этой стадии развития хорошо различимо крупное остаточное тело, от которого в разные стороны беспорядочно отходят жгутоподобные выросты, дающие начало микрогаметам.

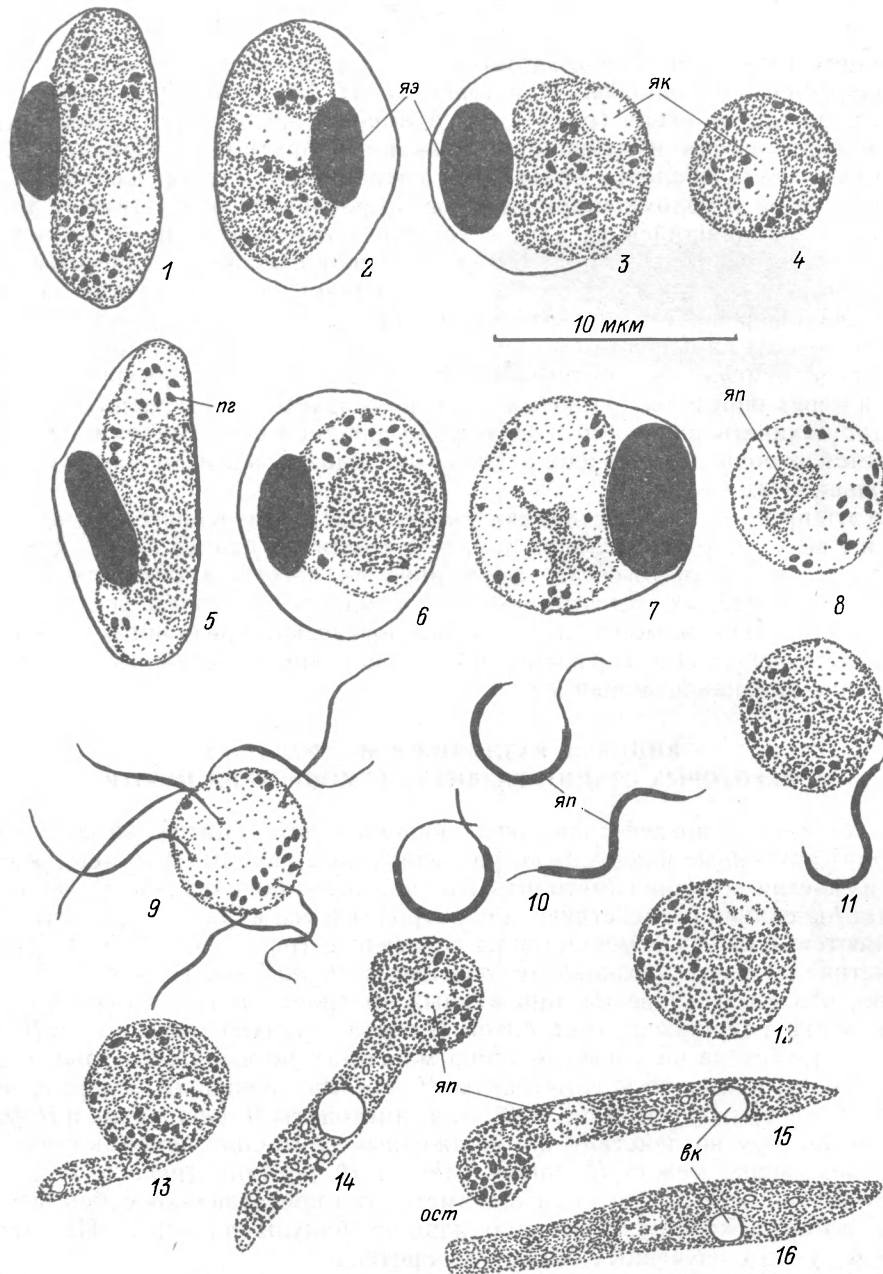


Рис. 1. Гаметогенез, формирование зиготы и оокинеты *Haemoproteus tartakovskiy* in vitro.

1, 5 — зрелые макрогаметоцит (1) и микрогаметоцит (5) в периферической крови клеста-еловика до начала гаметогенеза; 2—3 — округлившийся макрогаметоцит; 4 — макрогамета; 6—7 — округлившийся микрогаметоцит; 8 — свободный микрогаметоцит; 9 — эксфлагелляция; 10 — микрогаметы; 11 — оплодотворение макрогаметы; 12 — зигота; 13 — начальная стадия формирования оокинеты; 14 — среднеформированная оокинета; 15 — оокинета с остаточным телом; 16 — оокинета без остаточного тела.

На рис. 1—5: вк — вакуоль; пг — пигментные гранулы; яп — ядро паразита; яэ — ядро эритроцита.

Fig. 1. *Haemoproteus tartakovskiy* gametogenesis, zygote and ookinete formation in vitro.

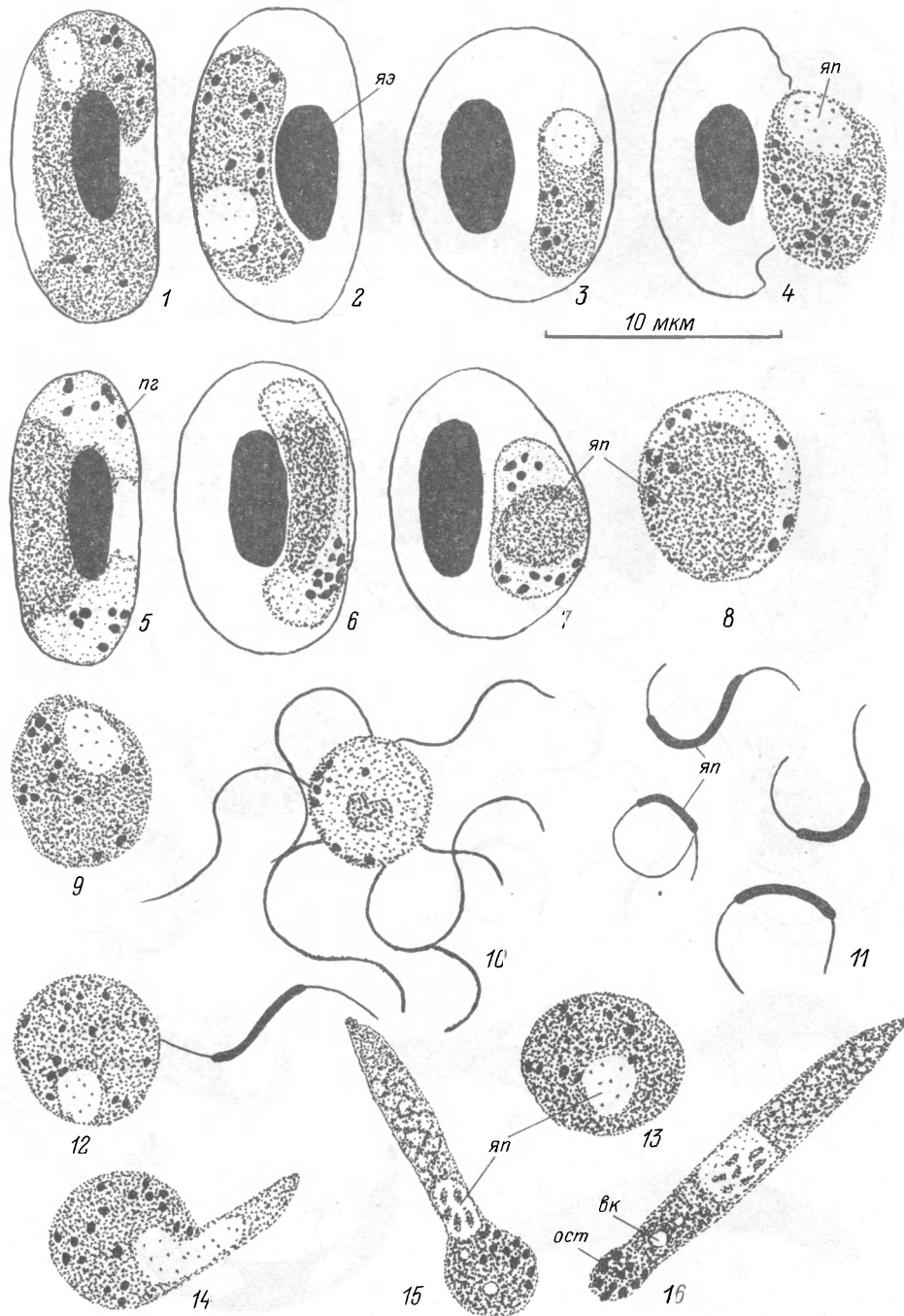


Рис. 2. Гаметогенез, формирование зиготы и оокинеты *Haemoproteus belopolskyi* in vitro.
 1, 5 — зрелые макрогаметоцит (1) и микрогаметоцит (5) в периферической крови зеленой пересмешки до начала гаметогенеза; 2—4 — округлившийся макрогаметоцит; 6—7 — округлившийся микрогаметоцит; 8 — свободный микрогаметоцит; 9 — макрогамета; 10 — эксфлагелляция; 11 — микрогаметы; 12 — оплодотворение макрогаметы; 13 — зигота; 14 — начальная стадия формирования оокинеты; 15 — среднесформированная оокинета; 16 — оокинета с остаточным телом.
 Обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 2. *Haemoproteus belopolskyi*, gametogenesis, zygote and ookinete formation in vitro.

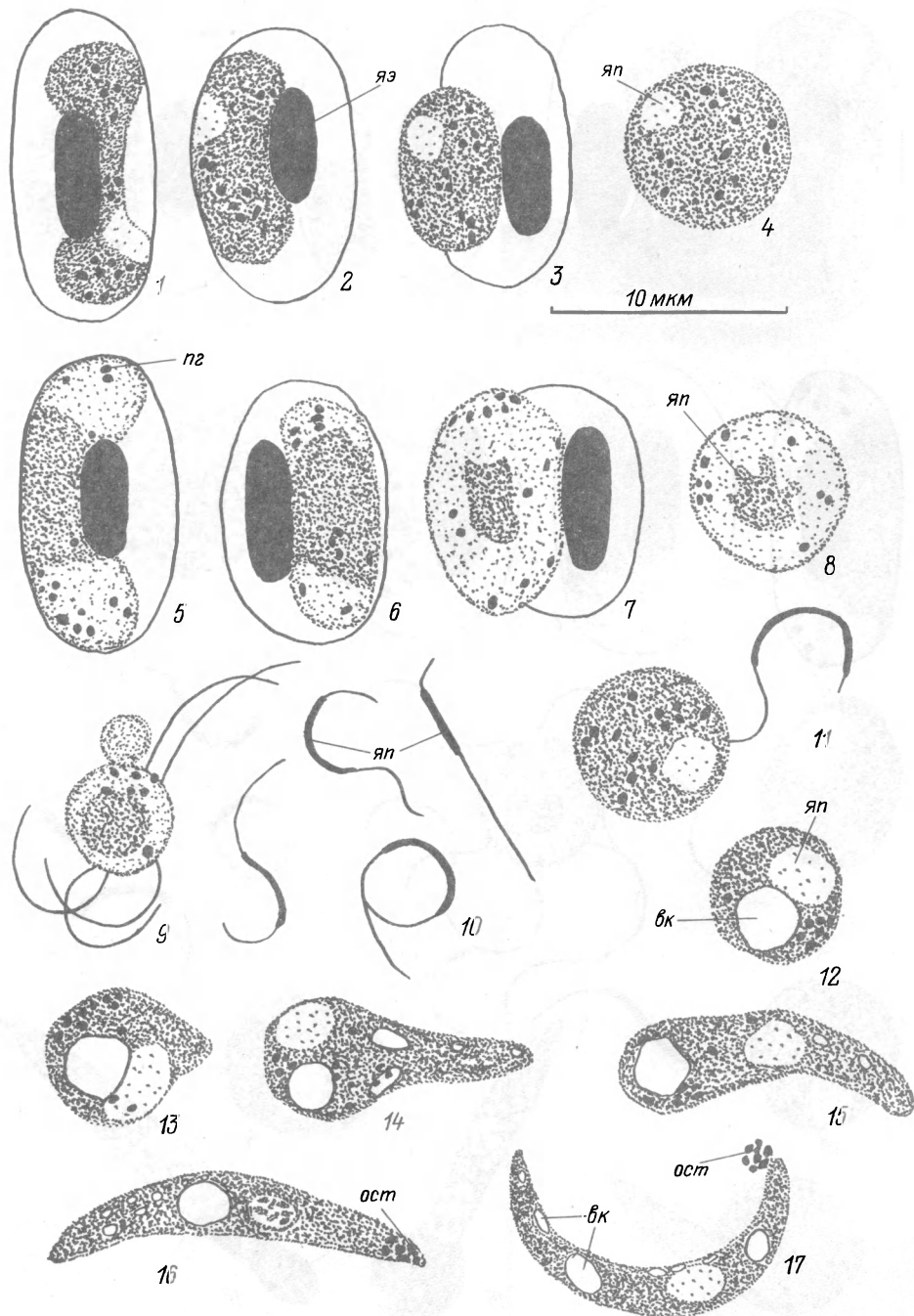


Рис. 3. Гаметогенез, формирование зиготы и оокинеты *Haemoproteus fringillae* in vitro.
 1, 5 — зрелые макрогаметоцит (1) и микрогаметоцит (5) в периферической крови зяблика до начала гаметогенеза; 2—3 — округлившийся макрогаметоцит; 4 — макрогамета; 6—7 — округлившийся микрогаметоцит; 8 — свободный микрогаметоцит; 9 — эксфлагелляция; 10 — микрогаметы; 11 — оплодотворение; 12 — зигота; 13 — начальная стадия формирования оокинеты; 14—15 — среднесформированная оокинета; 16—17 — оокинета с остаточным телом.
 Обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 3. *Haemoproteus fringillae* gametogenesis, zygote and ookinete formation in vitro.

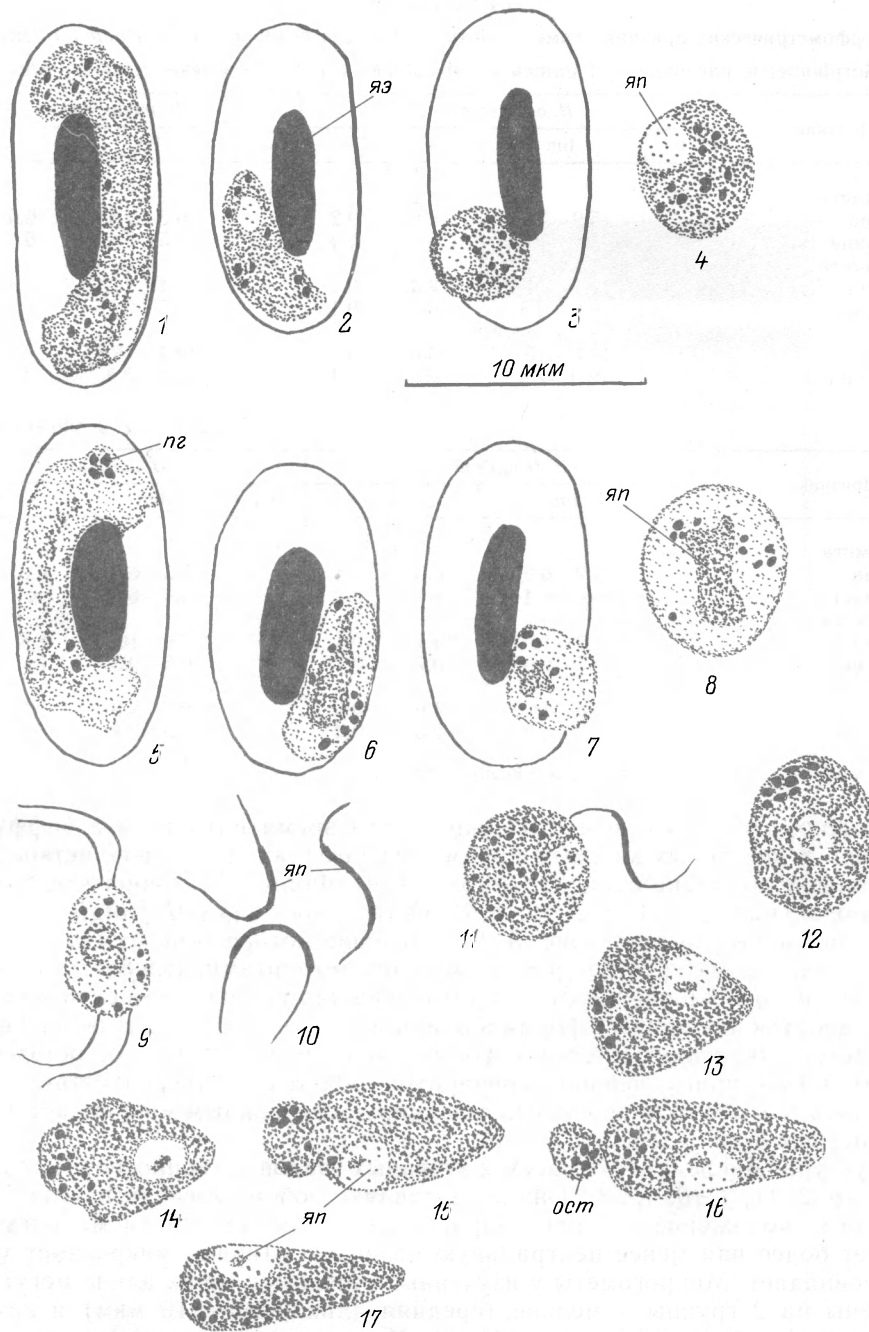


Рис. 4. Гаметогенез, формирование зиготы и оокинеты *Haemoproteus pallidus* in vitro.

1, 5 — зрелые макрогаметоцит (1) и микрогаметоцит (5) в периферической крови мухоловки-пеструшки до начала гаметогенеза; 2—3 — округлившийся макрогаметоцит; 4 — макрогамета; 6—7 — округлившийся микрогаметоцит; 8 — свободный микрогаметоцит; 9 — эксфлагелляция; 10 — микрогаметы; 11 — оплодотворение; 12 — зигота; 13 — начальная стадия формирования оокинеты; 14—15 — среднесформированная оокинета; 16 — оокинета с остаточным телом; 17 — оокинета без остаточного тела.
Обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 4. *Haemoproteus pallidus* gametogenesis, zygote and ookinete formation in vitro.

Т а б л и ц а 2

Морфометрические признаки гамет и оокинет 4 видов гемопротеусов (*Haemoproteus*)
Morphometric parameters of gametes and ookinetes of four species of *Haemoproteus*

Признак	<i>H. belopolskui</i>				<i>H. tartakovskiyi</i>			
	<i>n</i>	lim	\bar{X}	$m_{\bar{x}}$	<i>n</i>	lim	\bar{X}	$m_{\bar{x}}$
Макрогамета	31	5.9—7.7	6.6	0.2	20	6.3—7.4	6.6	0.1
длина		5.1—7.4	6	0.4		5—6.4	6	0.2
Микрогамета	11	11.1—14.4	12.4	0.7	20	11.4—14.4	12.8	0.2
длина		0.6—0.8	0.7	0.1		0.5—0.7	0.6	0.03
Оокинета	6	14.6—16.3	15.6	0.7	8	16.4—19.8	18	0.5
длина		2.0—2.3	2.2	0.1		2.1—2.8	2.6	0.2
ширина								

Т а б л и ц а 2 (продолжение)

Признак	<i>H. fringillae</i>				<i>H. pallidus</i>			
	<i>n</i>	lim	\bar{X}	$m_{\bar{x}}$	<i>n</i>	lim	\bar{X}	$m_{\bar{x}}$
Макрогамета	12	5.9—6.9	6.3	0.4	12	5.5—6.7	6.3	0.3
длина		5.5—6.4	6	0.2		5.4—6.5	6	0.2
Микрогамета	12	9.9—15.1	13.1	0.4	12	7.9—10	8.8	0.3
длина		0.6—0.9	0.7	0.1		0.6—0.8	0.7	0.04
Оокинета	12	12.6—16.2	14.6	0.6	12	8.6—9.9	9.2	0.3
длина		2—3.2	2.5	0.2		3—3.4	3.2	0.3
ширина								

П р и м е ч а н и е. Все размеры даны в микрометрах.

Обнаружено, что не все вещество ядра в это время находится в диффузном состоянии. У некоторых видов во время эксфлагелляции отмечено четкое крупное скопление хроматина (рис. 2, 10; 3, 9; 4, 9). Форма остаточного тела округлая или овальная (рис. 1, 9; 2, 10; 4, 9). Остаточное тело у *H. fringillae* обычно имеет шаровидный вырост (рис. 3, 9), значение которого не известно.

Число микрогамет, продуцируемых микрогаметоцитами, колеблется от 4 до 8. Точное их число в окрашенных препаратах в каждом конкретном случае определить трудно, так как процесс формирования микрогамет проходит очень быстро. Кроме того, микрогаметы легко деформируются и отделяются от остаточного тела во время приготовления препаратов. Однако с уверенностью можно утверждать, что число микрогамет, продуцируемых каждым микрогаметоцитом, не превышает 8.

Структура микрогамет у всех изученных видов гемопротеид идентична (рис. 1, 10; 2, 11; 3, 10; 4, 10). Они представляют собой змеевидные тела с крупным ядром, положение которого вариабельно. Обычно ядро в микрогаметах занимает более или менее центральную позицию. Ширина микрогамет у всех видов совпадает. Микрогаметы у изученных паразитов по их длине могут быть разделены на 2 группы — мелкие (средняя длина менее 10 мкм) и крупные (средняя длина более 10 мкм) (табл. 2). Микрогаметы *H. pallidus* достоверно короче, чем таковые у *H. tartakovskiyi* (критерий достоверности различий, $t_d=13.3$; уровень значимости, $P<0.001$), *H. belopolskii* ($t_d=4.7$, $P<0.001$), *H. fringillae* ($t_d=8.6$, $P<0.001$).

Процесс оплодотворения макрогамет отмечен одновременно с появлением свободных микрогамет и проходит единообразно у всех изученных видов (рис. 1, 11; 2, 12; 3, 11; 4, 11). В это же время обнаружены первые зиготы. Общие отличительные признаки, по которым можно дифференцировать макрогаметы

от зигот, выявить не удалось. Однако у некоторых видов макрогаметы можно отличить от зигот. У *H. tartakovskyi* такие признаки не выявлены. Макрогаметы и зиготы у этого вида можно дифференцировать с некоторыми допущениями лишь по времени их появления. Макрогаметы и зиготы *H. belopolskyi* можно отличить по интенсивности окраски цитоплазмы. Цитоплазма зигот у этого вида окрашена интенсивнее, чем у макрогамет. В зиготах *H. fringillae* присутствует одна крупная вакуоль, которую не удавалось наблюдать в макрогаметах (рис. 3, 11, 12). В зиготах *H. pallidus* пигментные гранулы обнаруживают четкую тенденцию к группировке в одном месте (рис. 4, 12), что нехарактерно для макрогамет (рис. 4, 11).

Наибольшим разнообразием диагностических признаков у изученных видов характеризуются ранние стадии развития оокинет и сформированные оокинеты.

Выявлено 3 типа начальных стадий формирования оокинет. Первый тип характерен для *H. tartakovskyi* и *H. belopolskyi*. Формирование оокинеты у этих видов начинается с появления тонкого длинного пальцевидного выроста, расположенного по касательной к основному телу паразита (рис. 1, 13; 2, 14). По мере роста оокинеты этот вырост увеличивается в размерах и дает начало переднему (апикальному) концу оокинеты. Второй тип характерен для *H. fringillae*. У этого вида в средней части паразита появляется короткий тупой вырост (рис. 3, 13), который по мере роста вытягивается и придает формирующейся оокинете грушевидную (кеглевидную) форму (рис. 3, 14). Третий тип отмечен у *H. pallidus*. Формирование оокинеты *H. pallidus* идет без образования каких-либо четко выраженных выростов. Трансформирующиеся оокинеты этого вида приобретают треугольную форму (рис. 4, 13). На одной из сторон этого «треугольника» отмечается скопление пигмента, а противоположный «угол» вытягивается, давая начало оокинете (рис. 4, 14—16).

На одном из концов средневыросших оокинет у всех изученных видов отмечено скопление пигмента. У полностью сформированных оокинет пигмент вместе с прилегающим участком цитоплазмы отделяется в виде остаточного тела (рис. 1, 15; 2, 16; 3, 17; 4, 16). При этом в полностью сформированных оокинетах пигментные гранулы либо отсутствуют, либо присутствуют в небольшом числе. Отметим, что последовательность формирования остаточного тела и его строение различны у разных видов. У подавляющего большинства формирующихся оокинет *H. belopolskyi* компактное остаточное тело является плавным продолжением основного тела оокинет (рис. 2, 16), а у *H. tartakovskyi* — расположено асимметрично по отношению к продольной оси паразита (рис. 1, 15). В формирующихся оокинетах *H. fringillae* остаточное тело не отделено перетяжкой (рис. 3, 16) и его можно обнаружить только по концентрации пигмента (рис. 3, 16). Остаточное тело у средневыросших оокинетах *H. pallidus* наиболее четко выражено и имеет почти правильную шаровидную форму (рис. 4, 16).

Форма выросших оокинет варьирует от удлиненно-червеобразной (*H. tartakovskyi*, *H. belopolskyi*, *H. fringillae*) до удлиненно-морковевидной (*H. pallidus*). Размеры оокинет также варьируют (табл. 2). Самые короткие оокинеты отмечены у *H. pallidus*. Их длина достоверно меньше, чем у *H. fringillae* ($t_d=8$, $P<0.001$), *H. tartakovskyi* ($t_d=15.2$, $P<0.001$) и *H. belopolskyi* ($t_d=8.4$, $P<0.001$). Самые длинные оокинеты формируются у *H. tartakovskyi*. Их длина достоверно больше, чем у *H. fringillae* ($t_d=4.4$, $P<0.001$), *H. belopolskyi* ($t_d=2.8$, $P<0.05$), *H. pallidus*. Наибольшая ширина отмечается у оокинет *H. pallidus* (табл. 2). Оокинеты последнего вида достоверно шире, чем таковые у *H. fringillae* ($t_d=3.5$, $P<0.01$), *H. tartakovskyi* ($t_d=3.0$, $P<0.01$) и *H. belopolskyi* ($t_d=3.3$, $P<0.01$).

Одна из отличительных особенностей оокинет изученных видов — присутствие или отсутствие в цитоплазме одной или нескольких крупных вакуолей (=кристаллоид). Наиболее крупные и хорошо выраженные вакуоли формиру-

ются в оокинете *H. fringillae* (рис. 3, 13—17) и *H. tartakovskyi* (рис. 1, 14—16). Отметим, что *H. fringillae* — единственный вид, у которого эта вакуоль появляется на стадии зиготы (рис. 3, 12). В оокинетах *H. pallidus* выявить вакуоли не удавалось (рис. 4, 13—17). Промежуточное положение между *H. fringillae* и *H. tartakovskyi*, с одной стороны, и *H. pallidus* — с другой, занимает *H. belopolskyi*. У последнего вида в цитоплазме регистрируется несколько мелких вакуолей (рис. 2, 15—16).

ВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ФОРМИРОВАНИИ НЕКОТОРЫХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ГЕМОПРОТЕИД IN VITRO ВО ВРЕМЕНИ

Данные о скорости гаметогенеза, формирования зигот и оокинет приведены в табл. 1.

Гаметогенез и появление зигот у всех 4 изученных видов гемопротеид проходит относительно быстро и примерно с одинаковой скоростью. Через 4—6 мин после экспозиции крови, содержащей зрелые гаметоциты на воздухе, у *H. tartakovskyi*, *H. belopolskyi* и *H. pallidus* отмечается оплодотворение макрогамет и появляются зиготы. У *H. fringillae* этот процесс имеет место в интервале 5—10 мин. Наиболее быстро формируются зиготы у *H. tartakovskyi*, которые отмечены уже через 4 мин (табл. 1).

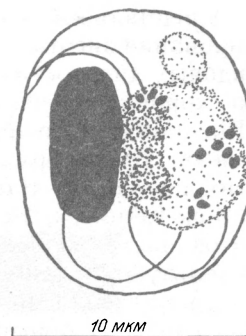
Отметим, что интенсивность заражения птиц различными видами гемопротеид отличалась. Наивысших значений она достигала у клестов-еловиков, зараженных *H. tartakovskyi*, и составляла 31 ($20 \div 42$) гаметоцит на 1000 эритроцитов. Т. е. в крови клестов-еловиков содержалось наибольшее число зрелых гаметоцитов по сравнению с другими видами гемопротеид и как результат — наибольшее число гамет в единице объема крови. Скорее всего повышенная концентрация гамет технически облегчает микрогаметам достижение макрогамет и, таким образом, ускоряет оплодотворение и появление зигот. Этим, вероятно, можно объяснить более ранние сроки формирования зиготы у *H. tartakovskyi* по сравнению с *H. pallidus*. Гаметы у *H. pallidus* появляются примерно в 4 раза быстрее, чем у *H. tartakovskyi* (табл. 1). Однако в виду низкой интенсивности заражения (7 ($3 \div 13$) гаметоцитов на 1000 эритроцитов) мухоловки-пеструшки видом *H. pallidus* число гамет в единице объема крови невелико, что препятствует быстрому оплодотворению и формированию зигот.

Различия в концентрации гамет в единице объема крови у всех 4 изученных видов гемопротеид препятствуют проведению детальных межвидовых сравнений скорости появления зигот. Тем не менее с уверенностью можно утверждать, что процесс этот проходит быстро. Первые зиготы у всех изученных видов появляются в интервале от 4 до 10 мин после экспозиции зрелых гаметоцитов на воздухе. Какие-либо отличия во времени прохождения гаметогенеза, имеющие видовую диагностическую ценность, по имеющимся в нашем распоряжении данным выявить трудно в виду того, что этот процесс идет очень быстро. Межвидовые различия в скорости гаметогенеза существуют, но для их оценки требуются специальные исследования. Отметим только, что свободные микрогаметы у *H. pallidus* в проведенных экспериментах появляются примерно в 4 раза быстрее, чем у других видов (табл. 1).

Формирование микрогамет у всех видов происходит в течение 1—4 мин после экспозиции крови со зрелыми гаметоцитами на воздухе. Интересно отметить, что в некоторых случаях микрогаметоциты не успевают покинуть эритроциты до начала эксфлагелляции. В этом случае эксфлагелляция имеет место внутри зараженного эритроцита (рис. 5). Судьба микрогамет, формирующихся внутри эритроцита, неясна. Скорее всего они не играют значительной роли в оплодотворении макрогамет, так как их доля среди «нормально» формирующихся микрогамет мала. Эксфлагелляция внутри эритроцитов отмечена у *H. fringillae* и *H. pallidus*.

Рис. 5. Эксфлагелляция *Haemoproteus fringillae* внутри зараженного эритроцита.

Fig. 5. Exflagellation of *Haemoproteus fringillae* microgametocyte inside of infected erythrocyte.



Процесс гаметогенеза и формирование зиготы у всех изученных видов не синхронизирован и сильно растянут во времени (табл. 1). Как уже отмечалось, первые зиготы у разных видов появляются через 4—10 мин после экспозиции зрелых гаметоцитов на воздухе. Однако процесс оплодотворения макрогамет регистрируется по меньшей мере в течение 3 ч. Это свидетельствует о том, что в течение 3 ч присутствуют жизнеспособные гаметы паразитов.

Четкие видовые различия выявлены в отношении времени трансформации округлой зиготы в удлиненную оокинету. По этому признаку изученные виды можно разделить на 3 группы.

В первую группу входит *H. pallidus*. Процесс формирования оокинеты этого вида проходит особенно быстро. Начальные стадии формирования оокинеты *H. pallidus* (рис. 4, 13) отмечены через 30 мин, а полностью сформированные оокинеты (рис. 4, 17) — через 45 мин после экспозиции крови на воздухе (табл. 1). Таким образом, онтогенез оокинеты у *H. pallidus* занимает всего около 15 мин.

Во вторую группу входит *H. tartakovskyi*. Процесс формирования оокинеты у этого вида происходит наиболее медленно. Напомним, что первые зиготы *H. tartakovskyi* появляются через 4 мин после экспозиции зрелых гаметоцитов на воздухе, т. е. несколько раньше, чем у других видов. В то же время появление начальных стадий формирования оокинеты у *H. tartakovskyi* сдвинуто на значительно более поздние сроки, чем у других видов (табл. 1). Первые сформированные оокинеты *H. tartakovskyi* (рис. 1, 16) отмечены через 48 ч. Таким образом, скорость формирования оокинеты у *H. tartakovskyi* примерно в 60 раз меньше, чем у *H. pallidus*.

В третью группу входят виды (*H. belopolskyi*, *H. fringillae*), которые по скорости формирования оокинеты занимают промежуточное положение между *H. pallidus* и *H. tartakovskyi*. Начальные стадии формирования оокинеты *H. belopolskyi* и *H. fringillae* (рис. 2, 14; 3, 13) отмечены в интервале 1.5 и 3 ч, а оокинеты с не отделившимся остаточным телом (рис. 2, 16; 3, 17) — через 6 ч (табл. 1). Таким образом, оокинеты с остаточным телом у видов третьей группы формируются примерно в 12 раз медленнее, чем у *H. pallidus* и в 6 раз быстрее, чем у *H. tartakovskyi*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гаметогенез, оплодотворение, формирование зиготы и оокинеты гемоспоридий в природе при нормальном развитии паразитов проходит в средней кишке специфических переносчиков — кровососущих двукрылых (Diptera). Этот процесс также проходит *in vitro*, где его можно легко индуцировать в стандартных условиях, что неоднократно использовалось при изучении биологии этих паразитов (Garnham, 1966; Garnham e. a., 1967; Dessler, 1972; Roller, Dessler, 1973).

Специальные исследования по сравнению особенностей гаметогенеза, формирования зиготы и оокинеты у разных видов гемоспоридий с целью выявления видовых диагностических признаков не проводились даже в таких относительно хорошо изученных группах гемоспоридий, как малярийные паразиты (Plasmodiidae) птиц, грызунов и приматов. Сведения об особенностях гаметогенеза, трансформации оокинеты не используются при определении видов этих паразитов (Garnham, 1966; Coatney e. a., 1971; Seed, Manwell, 1977; Killick-Kendrick, Peters, 1978). Видовая дифференциация малярийных паразитов частично облегчается тем, что в качестве диагностических признаков используются данные по строению эритроцитарных меронтов и особенностях эритроцитарной мерогонии. В случае лейкоцитозоид (Leucocytozoidae) и гемопротеид (Haemoproteidae) при определении видов обычно приходится ограничиваться морфологией гаметоцитов и особенностями их воздействия на клетку-хозяина. При этом ни один вид, как правило, нельзя определить по какому-либо одному признаку, а требуется анализ комплекса особенностей развития гаметоцитов. Однако и в этом случае близкие виды не всегда удается отличить. В этой связи расширение видовых диагностических признаков гемоспоридий представляется актуальным. Изучение гаметогенеза, формирования зиготы и оокинеты *in vitro* дает дополнительную информацию по этому вопросу.

Процесс трансформации зрелых гаметоцитов, гаметогенез, оплодотворение, формирование зиготы и оокинеты у *Haemoproteus tartakovskyi*, *H. belopolskyi*, *H. jringillae*, *H. pallidus* *in vitro* идет единообразно по свойственной всем гемоспоридиям схеме (рис. 1—4; табл. 1). Следует лишь подчеркнуть, что при формировании макрогамет нам не удалось обнаружить деление освободившихся из эритроцита макрогаметоцитов на остаточное тело и собственно макрогамету, как это отмечено Дессером (Desser, 1972) у *Haemoproteus* (= *Parahaemoproteus*) *velans*. Освободившиеся из клетки-хозяина макрогаметоциты у изученных нами видов гемопротеид без каких-либо видимых на светооптическом уровне преобразований дают начало макрогамете, что имеет место у всех гемоспоридий (Garnham, 1966; Coatney e. a., 1971; Killick-Kendrick, Peters, 1978). Вместе с тем Дессер (1972) утверждает, что наблюдал трансформацию живых макрогаметоцитов на остаточное тело и макрогамету в свежей крови, однако иллюстрации этого процесса не привел. Кроме того, он отмечает, что в окрашенных препаратах «остаточные тела» лишь изредка удалось наблюдать вблизи макрогамет, и они были сильно деформированы. По этой причине, как полагает Дессер, не удалось изучить трансформацию макрогаметоцитов на макрогамету и «остаточное тело» под электронным микроскопом. Отметим, что представленные в статье Дессера микрофотографии «с остаточного тела» (рис. 3—5) в окрашенных препаратах, на наш взгляд, вопрос не снимают, так как эти образования скорее — артефакты. Образование на рис. 3 в статье Дессера (1972) похоже на деформированную клетку лейкоцитарного ряда, а на рис. 4—5 — на компактные непромытые остатки краски, которые присутствуют в любых окрашенных препаратах. Отметим, что образование остаточного тела при формировании макрогамет у *H. velans* не отмечено Ханом и Фаллисом (Khan, Fallis, 1971), изучавшими развитие паразита в переносчике. Если принять гипотезу о макрогаметогенезе *H. velans* через стадию деления макрогаметоцита на остаточное тело и собственно макрогамету, то трудно объяснить, почему этот процесс Дессеру не удалось изучить под световым микроскопом при интенсивной гаметоцитемии. Все стадии превращения гаметоцитов изученных нами видов гемопротеид прекрасно видны под световым микроскопом в окрашенных препаратах. Гипотеза о трансформации макрогаметоцитов *H. velans* на остаточное тело и макрогамету требует проверки. На это следует обратить внимание также и потому, что сведения о макрогаметогенезе *H. velans* вошли в некоторые учебники в качестве эталонного при иллюстрации хода этого процесса у гемопротеид.

Преобразование освободившегося из эритроцита микрогаметоцита на гантелевидное тело перед эксфлагелляцией описано Дессером (Desser, 1972) у *Haemoproteus velans*. Нами этот процесс отмечен у *H. jringillae* (рис. 3, 9; 5). Отметим однако, что перед эксфлагелляцией *H. jringillae* микрогаметоцит дает начало лишь небольшому почковидному выросту, который полностью от микрогаметоцита не отделяется до завершения формирования микрогамета, в то время как у *H. velans*, согласно Дессеру, остаточное тело отделяется от микрогаметоцита до начала эксфлагелляции. У *H. tartakovskiyi*, *H. belopolskiyi*, *H. pallidus* (рис. 1, 9; 2, 10; 4, 9) микрогаметоциты претерпевают эксфлагелляцию без каких-либо видимых под световым микроскопом преобразований. Формирование остаточного тела при микрогаметогенезе, если и имеет место, то несомненно не свойственно всем видам гемопротейд.

Эксфлагелляция внутри эритроцитов, отмеченная нами у *Haemoproteus jringillae* и *H. pallidus* (рис. 5), наблюдалась Дессером (Desser, 1972) у *H. velans*. Доля микрогаметоцитов, эксфлагеллирующих внутри эритроцитов, невелика. Скорее всего эксфлагелляцию внутри клетки-хозяина следует рассматривать как отклонение от нормального процесса гаметогенеза.

Процесс гаметогенеза, формирования зиготы и оокинеты у изученных нами видов гемопротейд имеет ряд отличительных особенностей. Среди них можно отметить характер воздействия округлившихся гаметоцитов на зараженный эритроцит, длину микрогамета и строение зигот. Взятые в отдельности эти признаки не могут быть отнесены к группе хороших диагностических особенностей, так как совпадают у многих видов. Однако в качестве дополнительных критериев при определении видов использовать их можно. Так, по длине микрогамета *H. pallidus* хорошо отличается от *H. tartakovskiyi*, *H. belopolskiyi*, *H. jringillae* (табл. 2). Отметим, что при морфологической характеристике гемопротейд и определении близких видов на длину микрогамета следует обратить внимание. Длина микрогамета у гемопротейд варьирует в больших пределах. У *H. palumbis* длина микрогамета достигает 24 мкм (Baker, 1963, 1966), что примерно в 2 раза больше, чем у *H. tartakovskiyi*, *H. belopolskiyi* и в 3 раза больше, чем у *H. pallidus*.

Формирование крупной вакуоли на стадии зиготы отмечено только у *H. jringillae*. Природа этой вакуоли изучена Дессером и Трефиаком (Desser, Treiĭak, 1971). Под электронным микроскопом она имеет кристаллоидную структуру. Так называемый кристаллоид обычно регистрируется в оокинетах и спорозонтах гемоспоридий и скорее всего служит резервным энергетическим материалом. В его состав входят протеолипиды. При фиксации метанолом содержимое кристаллоида вымывается. В окрашенных препаратах на фоне темной цитоплазмы «пустые» вакуоли очень четко видны. У *H. tartakovskiyi* и *H. belopolskiyi* эти вакуоли отмечены только в оокинете, а у *H. pallidus* под световым микроскопом обнаружить их не удалось ни на одной из стадий развития паразита.

Наибольшим разнообразием признаков отличается стадия трансформации зиготы в оокинету (рис. 1, 13—16; 2, 14—16; 3, 13—17; 4, 13—17). По морфологии паразитов на этой стадии развития изученные нами виды гемопротейд можно легко отличить друг от друга. Кроме того, выявлены четкие различия в скорости формирования оокинеты разных видов *in vitro* (табл. 1). Так, оокинеты с остаточным телом у *H. belopolskiyi* и *H. jringillae* формируются примерно в 12 раз медленнее, чем у *H. pallidus*, и в 6 раз быстрее, чем у *H. tartakovskiyi*. Скорость формирования оокинеты у *H. pallidus* превышает таковую у *H. tartakovskiyi* примерно в 60 раз. Размеры оокинеты разных видов гемопротейд также отличаются (табл. 2). Все это позволяет утверждать, что морфологию трансформирующихся оокинеты и временные особенности этого процесса следует использовать при характеристике видов в первую очередь. По этим признакам виды гемопротейд можно сгруппировать в четко изолиро-

ванные группы, что существенно облегчает дальнейшую работу по видовой дифференциации. Например, близкие по строению гаметоцитов виды *H. mansonii* (= *H. canachites*) и *H. lophortyx* по начальным стадиям трансформации оокинеты (O'Roke, 1930; Fallis, Bennett, 1960) попадают в разные группы. Первый вид по этому признаку близок к *H. tartakovskyi*, а второй — к *H. jringillae*.

Отметим, что гаметогенез у *Haemoproteus palumbis* in vitro при температуре ниже 20° наблюдать не удавалось (Baker, 1966), в то время как у всех изученных нами видов этот процесс при температуре 18—20° успешно идет и завершается в течение 1—4 мин. Таким образом, способность к гаметогенезу при определенной температуре — еще один признак, который можно использовать в систематике.

Результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что детальное изучение гаметогенеза, формирования зиготы и оокинеты гемопротеид в стандартных условиях in vitro позволяет выделить ряд хороших дополнительных признаков, которые можно использовать при определении и изучении дивергенции видов. Среди этих признаков прежде всего следует отметить длину микрогамет, строение зигот, морфологические особенности трансформации зиготы в оокинету, размеры оокинеты, а также скорость формирования оокинеты in vitro.

Список литературы

- Baker J. R. The transmission of *Haemoproteus* sp. of English Woodpigeons by *Ornithomyia avicularia* // J. Protozool, 1963. Vol. 10, N 4. P. 461—465.
- Baker J. R. *Haemoproteus palumbis* sp. nov. (Sporozoa, Haemosporina) of the English Wood-Pigeon *Columba p. palumbus* // J. Protozool. 1966. Vol. 13, N 3. P. 515—519.
- Carter R., Diggs C. L. Plasmodia of rodents // Parasitic Protozoa. Vol. 3. / Ed. J. P. Kreier. N. Y. etc., 1977. P. 359—465.
- Coatney G. R., Collins W. E., Warren Mc., Contacos P. G. The primate malaria. Bethesda, 1971. 366 p.
- Desser S. S. Gametocyte maturation, exflagellation and fertilization in *Parahaemoproteus* (= *Haemoproteus*) *velans* (Coatney et Roudabush) (Haemosporidia: Haemoproteidae): an ultrastructural study // J. Protozool. 1972. Vol. 19, N 2. P. 287—296.
- Desser S. S., Trefiak W. D. Crystalline inclusions in *Leucocytozoon simondi* // Can. J. Zool. 1971. Vol. 49, N 1. P. 134—135.
- Fallis A. M., Bennett G. F. Description of *Haemoproteus canachites* n. sp. (Sporozoa: Haemoproteidae) and sporogony in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) // Can. J. Zool. 1960. Vol. 38, N 3. P. 455—464.
- Fallis A. M., Desser S. S. On species of *Leucocytozoon* // Adv. Parasitol. 1974. Vol. 12. P. 1—67.
- Fallis A. M., Desser S. S. On species of *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepatocystis* // Parasitic Protozoa. Vol. 3. / Ed. J. P. Kreier. N. Y. etc., 1977. P. 239—267.
- Garnham P. C. C. Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford, 1966. 1114 p.
- Garnham P. C. C. Recent research on malaria in mammals excluding man // Adv. Parasitol. 1973. Vol. 41. P. 603—630.
- Garnham P. C. C., Bird R. G., Baker J. R. Electron microscope studies of motile stages of malaria parasites. V. Exflagellation in *Plasmodium*, *Hepatocystis* and *Leucocytozoon* // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1967. Vol. 1, N 1. P. 58—68.
- Khan R. A., Fallis A. M. A note on the sporogony of *Parahaemoproteus velans* (= *Haemoproteus velans* Coatney and Roudabush) (Haemosporidia: Haemoproteidae) in species of *Culicoides* // Can. J. Zool. 1971. Vol. 49, N 3. P. 420—421.
- Killick-Kendrick R., Peters W. (Ed). Rodent malaria. N. Y. etc., 1978. 391 p.
- Kruse W. Ueber Blutparasiten // Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. 1890. Bd 121. S. 359—372.
- Mohammed A. H. H. Systematic and experimental studies on protozoal blood parasites of Egyptian birds. Vol. 1—2. Cairo Univ. Press, 1958. 298 p.
- O'Roke E. C. The morphology, transmission, and life-history of *Haemoproteus lophortyx* O'Roke, a blood parasite of the California Valley Quail // Univ. Calif. Publ. Zool. 1930. Vol. 36. P. 1—50.
- Rastogi M., Maitra S. C., Sen A. B. Ontogeny of ookinete of *Plasmodium berghei* (NK 65): a scanning electron microscopic study // J. Com. Dis. 1989. Vol. 21, N 2. P. 129—132.

- Roller N. R., Desser S. S. The effect of temperature, age and density of gametocytes, and changes in gas composition on exflagellation of *Leucocytozoon simondi* // Can. J. Zool. 1973. Vol. 51, N 6. P. 577—587.
- Seed T. M., Manwell R. D. Plasmodia of birds // Parasitic Protozoa. Vol. 3./ Ed. J. P. Kreier. N. Y. etc., 1977. P. 311—357.
- Wasielewski T., Wülker G. Die Hämo-proteus-Infektion des Turmfalken // Arch. Schiffs Trop. Pathol. Therap. 1918. Bd 22. S. 3—100.
- Wenyon C. M. Protozoology. London, 1926. Vol. 2. 1563 p.

Институт экологии, Вильнюс, Литва

Поступила 7.05.1992

GAMETOGENESIS, ZYGOTE AND OOKINETE OF SOME SPECIES OF BIRDS'
HAEMOPROTEIDS (HAEMOSPORIDIA: HAEMOPROTEIDAE) FORMATION IN VITRO

G. A. Valkiunas, T. A. Iezhova

SUMMARY

Key words: gametogenesis, zygote, ookinete, *Haemoproteus tartakovskyi*, *H. belopolskyi*, *H. fringillae*, *H. pallidus*.

Observations were made through examination of thin blood films which were prepared at appropriate intervals from citrated fresh blood of infected birds. The comparative description of gametogenesis, zygote and ookinete formation of *Haemoproteus tartakovskyi*, *H. belopolskyi*, *H. fringillae*, *H. pallidus* under the light microscope is given for the first time. This process has a general pattern for all investigated haemoproteid species. It is shown that macrogametocyte has been transformed directly to macrogamete without forming a residual body, as it was noted by Desser (1972) for *H. (=Parahaemoproteus) velans*. The most informative signs, which can be used for haemoproteid systematics, were determined. Among them microgamete length, zygote structure, morphological features of developing ookinete as well as the rate of ookinete formation can be pointed out first of all. *H. pallidus* microgametes are twice shorter than *H. tartakovskyi*, *H. belopolskyi*, *H. fringillae* ones. A large clear vacuole is formed in zygote of *H. fringillae* only. The majority of diagnostic features has the developing ookinetes. On the basis of ookinetes morphology the investigated species of haemoproteids can be determined easily. There were clear differences between haemoproteid species on the rate of ookinete formation. The ookinetes of *H. belopolskyi* and *H. fringillae* are formed for about 12 times more slowly than *H. pallidus* ones, and for about 6 times more rapidly than *H. tartakovskyi* ones. The peculiarities of gametogenesis, zygote and ookinete formation under the stable conditions in vitro can be used as usefull additional signs for determination of haemoproteid species.