

**ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ И ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
СТАДИЙ ЭНДОГЕННОГО РАЗВИТИЯ EIMERIA AKERIANA
(COCCIDIUM, EIMERIIDAE) ИЗ МАЛОАЗИЙСКОЙ ПЕСЧАНКИ****М. А. Мусаев, С. Г. Исмаилов, Г. Д. Гаибова**

Институт зоологии АН АзССР, Баку

Изучен жизненный цикл *Eimeria akeriana*. Приводятся данные о сроках появления эндогенных стадий, выделения ооцист, локализации кокцидий. Дается описание эндогенных стадий и прослежено в них распределение нуклеиновых кислот, общих белков и полисахаридов.

В лаборатории протистологии Института зоологии АН АзССР в течение ряда лет проводятся исследования жизненных циклов кокцидий песчанок Азербайджана. Последние являются широко распространенной группой грызунов, приносящей значительный ущерб народному хозяйству. Они являются вредителями сельского хозяйства и в то же время служат переносчиками особо опасных инфекций. Фауна кокцидий песчанок Азербайджана изучена довольно подробно (Мусаев, Вейсов, 1965), расшифрованы и цитохимически изучены жизненные циклы у 7 видов кокцидий из песчанок краснохвостых (Исмаилов, 1969; Гаибова, 1972), песчанок Виноградова (Мусаев и др., 1977а, 1977б) и малоазийских (Мусаев и др., 1978). В данной работе рассматриваются жизненный цикл и цитохимия эндогенных стадий *Eimeria akeriana* Ismailov et Gaibova, 1981 — недавно описанного кишечного паразита из малоазийской песчанки—*Meriones blackleri*¹ (Исмаилов, Гаибова, 1981).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили 1-, 2-месячные малоазийские песчанки, зараженные ооцистами *E. akeriana* (доза 10 000—30 000). Песчанки первоначально были отловлены в окрестностях р. Акера в Геянской степи при помощи сотрудников Гадрутской противочумной станции. В лаборатории протистологии они были разведены в количестве, необходимом для проведения экспериментальной работы.

Зараженных песчанок вскрывали ежедневно в препатентный период и в первые 2—3 дня патентного периода. Из пораженного кишечника каждые 4—5 см вырезали кусочек длиной 1 см и фиксировали смесью Карнуа. В дальнейшем из них готовили парафиновые срезы по обычной методике. Для изучения морфологии эндогенных стадий гистопрепараты окрашивали железным гематоксилином по Гейденгайну. Нуклеиновые кислоты выявляли с помощью окраски галлоцианином-хромовыми квасцами и метиловым зеленым-пиронином. Контрольные препараты перед окраской галлоцианином обрабатывали рибонуклеазой в концентрации 1 мг/мл в течение 1 ч при температуре 37°. Для выявления ДНК применяли реакцию Фельгена. Общие белки определяли после окрашивания бром-феноловым синим в насыщенном растворе сулемы. Полисахариды эндогенных стадий *E. akeriana* выявляли, используя метод Веста и реакцию ШИК. Контрольные препараты перед реакцией ШИК обрабатывали птиалином слюны в течение 20 мин при 37°. Вещество, которое в результате действия птиалина

¹ *Meriones blackleri* Thom.=*M. tristrami* Nept.

удалялось со срезов, мы считали амилопектином (Ryley e. a., 1969). Применяли также краситель альциановый синий, который окрашивает кислые мукополисахариды.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эндогенные стадии развития *E. akeriana* локализуются в тонком кишечнике. Наибольшее скопление их отмечено в двенадцатиперстной и тощей кишках (рис. 1). В подвздошной встречаются единичные стадии развития. Как бесполое, так и половые стадии развития располагаются над ядрами эпителиальных клеток ворсинок кишечника. Последние, пораженные паразитом, значительно увеличиваются в размерах и теряют свою обычную форму. Особенно сильно деформируются клетки хозяина в период гаметогонии паразита.

Через 70 ч после заражения в эпителии двенадцатиперстной и в верхнем отделе тощей кишки уже можно обнаружить сегментированных зрелых шизонтов с 12—32 мерозоидами в них. Через 94 ч были обнаружены шизонты с меньшим количеством мерозоидов (10—26). Через сутки наряду с описанными встречались шизонты с 4—20 мерозоидами заметно меньших размеров. Спустя 3 дня, т. е. через 187 ч, после заражения были обнаружены шизонты с 14—32 мерозоидами. Размеры всех обнаруженных шизонтов представлены в таблице. Мерозоиды имели типичную удлиненную форму, один конец более острый.

В ядрах сегментированных шизонтов ДНК располагается по периферии ядра, образуя кольцо. При выявлении РНК ярко окрашивалась карิโอзома, цитоплазма имела диффузное окрашивание. В мерозоидах более темное окрашивание было на заостренном конце. При окраске бром-феноловым синим цитоплазма и нуклеоплазма отдельных мерозоидов окрашивались с почти одинаковой интенсивностью, кариосома была ярко окрашена (рис. 2, 1, 3, 7; см. вкл.).

В растущих шизонтах *E. akeriana* амилопектин обнаруживается в виде мелких гранул, очень мало-численных. В сегментированных шизонтах и в отдельно лежащих свободных мерозоидах цитоплазма вся заполнена гранулами амилопектина. Заметной разницы в содержании амилопектина у шизонтов и мерозоидов разных генераций мы не обнаружили (рис. 2, 9).

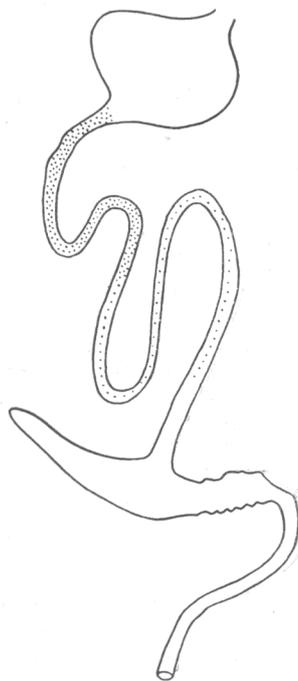


Рис. 1. Схема локализации эндогенных стадий *E. akeriana* в кишечнике малоазийской песчанки.

Размеры шизонтов *E. akeriana*

Часы после заражения	Количество мерозоидов в шизонтах	Размеры в мкм ($M \pm m$)	
		длина	ширина
70	12—32 (19)	8.0—14.0 (10.88 ± 0.27)	6.0—12.0 (9.32 ± 0.24)
94	10—26 (18)	8.0—13.0 (10.10 ± 0.19)	6.0—10.0 (8.33 ± 0.27)
118	4—22 (12)	6.0—11.0 (8.12 ± 0.37)	5.0—10.0 (6.48 ± 0.33)
187	14—32 (20)	11.0—20.0 (15.43 ± 0.38)	9.0—16.0 (12.10 ± 0.42)

Примечание. В скобках указано среднее количество мерозоидов.

Одновременно с шизонтами к 94 ч на срезах кишечника встречаются гамонты (рис. 3). На данном этапе гамонты еще трудно отличимы друг от друга и от мо-

лодых растущих шизонтов. Постепенно (по мере роста этих стадий) происходит их дифференциация. Зрелые макрогаметы достигают размеров $18.0—28.0 \times 16.0—24.0$ ($22.86 \pm 0.41 \times 20.34 \pm 0.34$). Размеры микрогаметоцитов перед самым распадением $13.0—23.0 \times 10.0—20.0$ ($19.12 \pm 0.32 \times 16.4 \pm 0.29$) мкм. Количество микрогамет в них от 50 до 170.

При проведении реакции Фельгена молодую макрогамету можно отличить от микрогаметоцита или шизонта, когда ее ядро перестает окрашиваться, однако оно слабо окрашивается метиловым зеленым. С ростом микрогаметоцита происходит деление ядер и перемещение их к периферии. Скопления ДНК уплотняются и принимают характерный для стадии микрогаметы вид запятой. Микрогаметы в микрогаметоцитах располагаются как бы по спирали вокруг одного центра (рис. 2, 2).

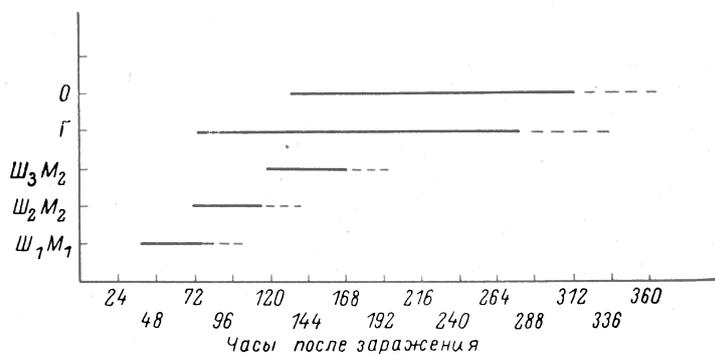


Рис. 3. Время появления и продолжительность развития стадий жизненного цикла *E. akeriana*.

По оси абсцисс — часы после заражения, по оси ординат — стадии развития, цифры у букв — генерации.
Г — гамонты, О — ооцисты.
Остальные обозначения, как на рис. 2.

РНК выявлена в виде мелких зерен в цитоплазме макрогамет, в микрогаметоцитах она обнаружена перед самым их распадением в остаточном теле. Кариосома макрогаметы ярко окрашивается в розовый цвет при окраске метиловым зеленым-пиронином и в синий при окраске галлоцианин-хромовыми квасцами (рис. 2, 4—6). Все половые стадии интенсивно красятся бромфеноловым синим, при этом кариосома макрогамет имеет яркое окрашивание, цитоплазма красится диффузно (рис. 2, 8).

В макрогаметах *E. akeriana* амилопектин появляется в виде отдельных мелких зерен, когда они достигают размеров $7.0—8.0 \times 6.0—7.5$ ($7.7 \pm 0.33 \times 6.9 \pm 0.41$) мкм. По мере роста макрогамет количество зерен амилопектина увеличивается, и они заполняют всю цитоплазму, вплоть до зоны ядра. Сами зерна амилопектина становятся более крупными (рис. 2, 10). В микрогаметоцитах амилопектин выявляется только в остаточном теле перед самым их распадением.

Используя альциановый синий, нам не удалось выявить кислые мукополисахариды ни в одной эндогенной стадии развития *E. akeriana*. Через 5.5—6 суток после заражения начинается выделение ооцист, оно длится 9 суток. Таким образом, общая продолжительность кокцидиозной инвазии равна 14.5—15 суткам.

В молодых ооцистах, встреченных нами в просвете кишечника песчанки, трудно выявить какие-либо вещества, так как при уплотнении оболочки зиготы-ооцисты краситель не проникает внутрь клетки паразита.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как указывалось, первые сегментированные шизонты *E. akeriana* встречаются в большом количестве через 70 ч после заражения. Через 94 ч таковые обнаруживаются в значительно меньшем количестве. При этом оказалось, что разница между их размерами недостоверна. Все это дало нам основание считать, что на-

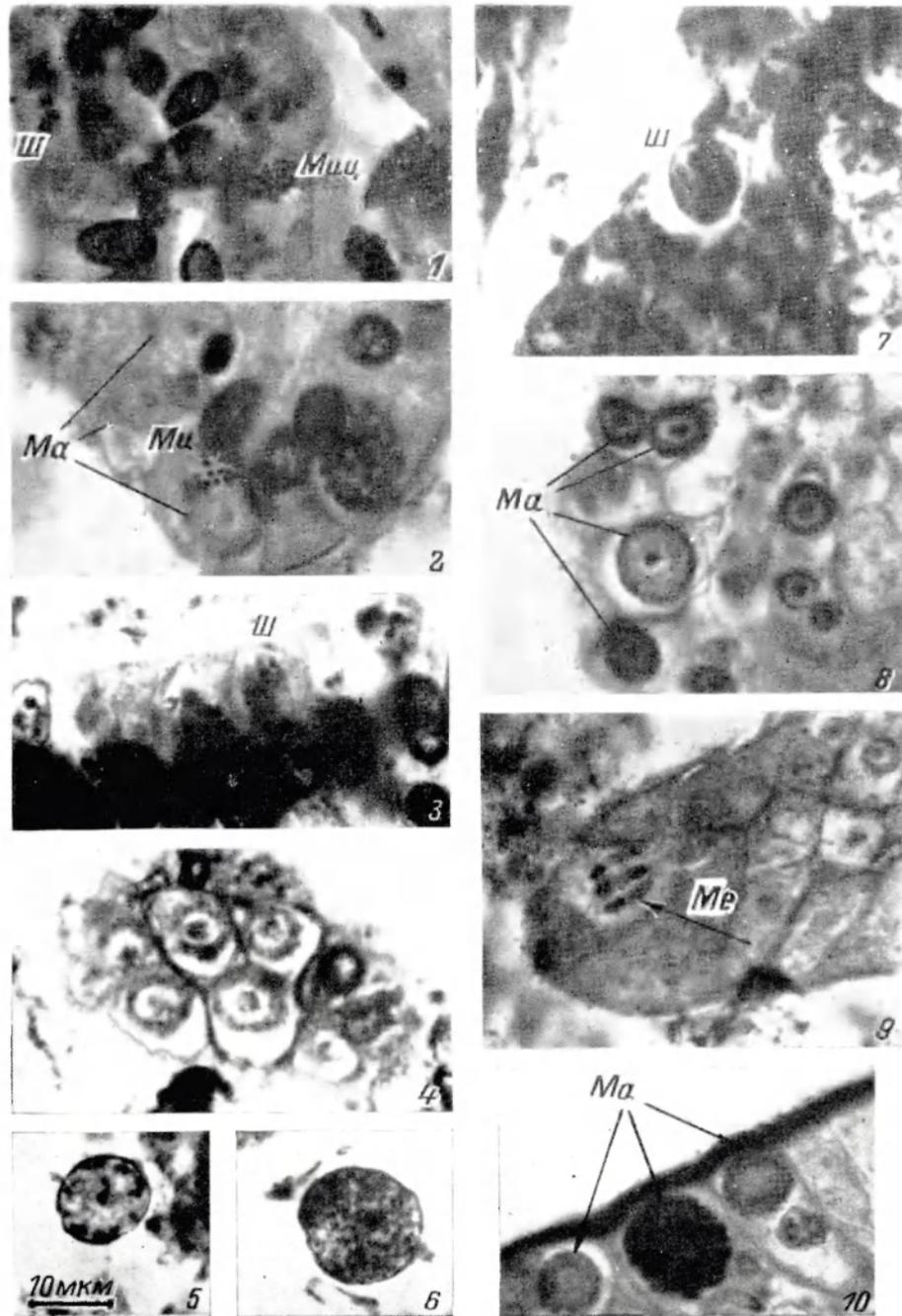
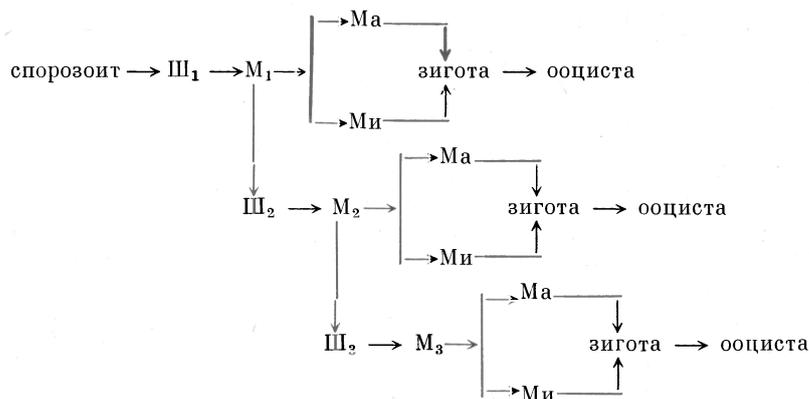


Рис. 2. Выявление нуклеиновых кислот, общих белков и амилопектина в стадиях эндогенного развития *E. akeriana*.

1, 2 — ДНК, реакция Фельгена (Ш, Ма, Миц, Ми — через 94 ч после заражения; Ма — неокрашены); 3—6 — РНК, окраска галлоцианинхромовыми квасцами (3 — Ш через 70 ч; 4, 5 — скопление Ма и зигота через 94 ч, стрелкой указаны периферические гранулы; 6 — молодая ооцита в просвете кишечника через 142 ч); 7, 8 — общие белки, окраска бром-феноловым синим; 9—10 — амилопектин, реакция ПИК (через 94 и 118 ч). Ме — мерозоит, Ми — микрогамета, Миц — микрогаметоцит, Ш — шизонт, Ма — макрогамета.

блюдаемые стадии являются шизонтами I генерации. Если сравнить жизненные циклы ранее изученных кокцидий песчанок, то обнаруживается, что шизогония и мерогония *E. akeriana* несколько растянуты во времени. Наличие в срезах, приготовленных через 94 ч, зрелых сегментированных шизонтов и половых стадий позволяет сделать вывод, что часть мерозоитов I генерации дает начало шизонтам II генерации, которые заканчивают свое развитие через сутки, т. е. к 118 ч, а часть — гамонтам. Мерозоиты II генерации дают начало шизонтам III генерации, развитие которых тоже довольно значительно растянуто во времени (до 187 ч) и половым стадиям. Все мерозоиты, образовавшиеся в результате распада шизонтов III генерации, превращаются в гамонты. К моменту образования первых ооцист, т. е. к концу препатентного периода, в организме хозяина еще продолжается агамное размножение. Схематически жизненный цикл *E. akeriana* можно представить следующим образом.



П р и м е ч а н и е. Ма — макрогамета, Ми — микрогамета, Ш — шизонт.

Все стадии эндогенного развития *E. akeriana* характеризуются наличием в ядре ДНК, выявляемой реакцией Фельгена, кроме макрогамет, однако в ядрах макрогамет ДНК выявлялась при окраске метиловым зеленым. Это явление свойственно не только кокцидиям песчанок, изученных нами, но и другим видам кокцидий (Хейсин, 1960; Бейер, 1963; Anwar, 1968; Гаибова, 1972). Принято считать, что Фельген-негативность ядра макрогаметы связана с деспирализацией хромосом (Хейсин, 1960; Бейер и др., 1978). Возможно, что такое состояние хромосом в ядре облегчает нормальное протекание процессов транскрипции (Бейер, 1979).

Клеточная масса паразита значительно увеличивается по мере роста шизонтов, микрогаметоцитов и макрогамет. Общеизвестна роль РНК при этом интенсивном белковом синтезе, происходящем в эндогенном развитии паразитов. При определении общих белков и РНК у *E. akeriana* мы не ставили перед собой конкретной задачи о выяснении зависимости синтеза белков от изменений распределения и количества РНК в каждой отдельной стадии паразита. Примененные нами цитохимические методики позволяют сделать лишь общий вывод о распределении РНК и о распределении более или менее сильно окрашенных бромфеноловым синим белковых гранул в отдельных стадиях развития паразита.

В крупных периферических гранулах, которые впоследствии участвуют в образовании оболочки макрогамет *E. schamchorica*, *E. arabiana*, *E. bistratum*, *E. dzahriana* (кокцидии песчанок), а также у *E. gliris* (паразит сони-полчка) (Гаибова, 1972; Гаибова, Исмаилов, 1978; Мусаев и др., 1978), была обнаружена РНК, не удаляемая РНК-азой. Видимо, РНК находилась в тесном комплексе с белками, что затрудняло ее ферментативное расщепление. У *E. akeriana* таких гранул нет, но иногда встречаются крупные макрогаметы с гранулами, ярко окрашенными галлоцианином. При окраске на общие белки почти во всех зрелых макрогаметах обнаруживаются крупные периферические гранулы. Эти же гранулы при окраске на амилопектин являются ШИК-негативными. Видимо, оболочка ооцист

E. akeriana имеет несколько отличную от других кокцидий цитохимическую природу.

Как уже указывалось выше, у *E. akeriana* амилопектин обнаруживается уже в растущих шизонтах. В сегментированных и в отдельно лежащих свободных мерозоитах цитоплазма вся заполнена гранулами амилопектина. В этих стадиях у изученных ранее кокцидий кроликов, птиц и грызунов амилопектин либо совсем не обнаруживался, либо встречался в небольших количествах, возрастая в каждой генерации (Хейсин, 1958, 1960; Бейер, 1963; Anwar, 1968; Гаибова, 1972; Мусаев и др., 1977а; Гаибова, Исмаилов, 1978). Существует мнение, что количество полисахаридов в мерозоитах разных генераций прямо пропорционально двигательной активности мерозоитов (Хейсин, 1958, 1960; Бейер, 1963), что ШИК-положительные мерозоиты дают начало макрогаметам, а ШИК-отрицательные (или слабо положительными) — микрогаметоцитам (Klimes e. a., 1972; Canning, 1973). Как правило, амилопектин в микрогаметоцитах *Eimeria* не обнаруживается, имеются только единичные наблюдения о наличии амилопектина в микрогаметоцитах и микрогаметах *E. tenella* (Gill, Ray, 1954; Hare, Strout, 1972), также у двух видов *Isospora* из воробьиных птиц (Anwar, 1968). Ни в растущих микрогаметоцитах, ни в микрогаметах *E. akeriana* амилопектин мы не обнаружили. Нам удалось обнаружить его только в остаточном теле микрогаметоцита перед самым его распадением. В микрогаметоците у *Toxoplasma gondii* амилопектин тоже был выявлен в остаточном теле, но его накопление было прослежено по мере роста микрогаметоцита (Бейер и др., 1977). Что касается макрогаметы *E. akeriana*, то в ней накопление вещества происходит по мере роста макрогаметы и достигает максимума к моменту оплодотворения. То же самое обнаружено и у всех других ранее изученных кокцидий. Хотя мы и не обнаружили у *E. akeriana* кислых мукополисахаридов, мы не можем считать, что их нет. Возможно, что полученный нами отрицательный результат вызван методическими причинами.

Л и т е р а т у р а

- Бейер Т. В. Цитохимическое исследование кишечных кокцидий кролика при разных условиях их существования в хозяине. — Автореф. канд. дис. Л., 1963. 27 с.
- Бейер Т. В. Цитологическое исследование кокцидий, облигатных внутриклеточных паразитов. — Автореф. докт. дис. Л., 1979. 37 с.
- Бейер Т. В., Сиим И. Х., Хатчисон У. М. Цитохимическое исследование разных стадий жизненного цикла *Toxoplasma gondii*. IX. Полисахариды и липиды на стадиях развития из кишечника кошки. — Цитология, 1977, т. 19, вып. 12, с. 1369—1373.
- Бейер Т. В., Шибалова Т. А., Костенко Л. А. Цитология кокцидий. Л., Наука, 1978, с. 69—112.
- Гаибова Г. Д. Сравнительное цитохимическое исследование жизненных циклов некоторых кокцидий грызунов Азербайджана при разных экологических условиях существования хозяина. — Автореф. канд. дис. Л., 1972. 25 с.
- Гаибова Г. Д., Исмаилов С. Г. Сравнительное цитохимическое исследование жизненных циклов 6 видов кокцидий песчанок. — В кн.: Матер. 1-й Закавказ. конф. по общей паразитол. Тбилиси, Мецниереба, 1978, с. 104—107.
- Исмаилов С. Г. Жизненные циклы кокцидий *Eimeria erythrougica* и *Eimeria schamchorica* паразитов краснохвостой песчанки (*Meriones erythrourus* Gray). — Автореф. канд. дис. Баку, 1969. 20 с.
- Исмаилов С. Г., Гаибова Г. Д. Новый вид кокцидий *Eimeria akeriana* sp. n. (Eimeriidae, Coccidiida) из малоазийской песчанки. — В кн.: Протозоологические исследования в Азербайджане. Баку, Элм, 1981, с. 15—17.
- Мусаев М. А., Вейсов А. М. Кокцидии грызунов СССР. Баку, Элм, 1965, с. 89—114.
- Мусаев М. А., Гаибова Г. Д., Исмаилов С. Г. Сравнительное цитотометрическое исследование амилопектина в процессе макрогаметогенеза у кокцидий песчанок Виноградова (*Meriones vinogradovi* Нерт.). — Изв. АН АЗССР, Сер. биол. наук, № 4, 1977, с. 73—79.
- Мусаев М. А., Исмаилов С. Г., Гаибова Г. Д. Жизненные циклы и распределение нуклеиновых кислот в стадиях эндогенного развития кокцидий (Coccidiida, Eimeriidae) песчанок Виноградова. — Паразитология, 1977а, т. 11, вып. 1, с. 57—64.
- (Мусаев М. А., Исмаилов С. Г., Гаибова Г. Д.) Musajev M. A., Ismailov S. G., Gaibova G. D. Life cycle and cytochemistry of endogenous development stages of *Eimeria dzhahariana* Vejsov, 1961. — 4th Inter. Congress on Parasitol., 1978, Warszawa, Short commun. Sec. B, p. 70.
- (Хейсин Е. М.) Cheissin E. M. Cytologische Untersuchungen verschiedener Stadien des Lebenszyklus des Kaninchencoccidien. 1. *Eimeria intestinalis* E. Cheissin 1948. — Archiv Protistenk., 1958, vol. 102, N 3/4, p. 265—290.

Хейсин Е. М. Цитологическое исследование жизненного цикла кокцидий кролика. 2. *Eimeria magna* Perard, 1924. — В кн.: Вопросы цитологии и протистологии, М.—Л., Изд-во АН СССР, 1960, с. 258—276.

Anwar M. Cytochemical investigation of *Isospora lacazei* and *I. chloridis* of the sparrow (*Passer domesticus*) and the greenfinch (*Chloris chloris*). — *Acta protozool.*, 1968, vol. 6, N 18, p. 209—220.

Canning E. Sexual differentiation in coccidia. — In: *Progress in protozool.*, 1973, Abstr. IV Intern. Congress Protozool., Clermont-Ferrand, p. 75.

Gill B. S., Ray H. Glycogen and its probable significance in *Eimeria tenella* Railliet et Lucet, 1891. — *Indian. Journ. Vet. Sci.*, 1954, vol. 24, p. 223—228.

Hare J. G., Strout R. G. Cytochemical observations on *Eimeria tenella* (Coccidia) propagated in cell culture. — *J. Parasitol.*, 1972, vol. 58, p. 567—575.

Klimes B., Rootes D. G., Tanielian L. Sexual differentiation of merozoites of *Eimeria tenella*. — *Parasitol.*, 1972, vol. 65, N 1, p. 131—136.

Ryley J. F., Bantley M., Manners D. J., Stark J. R. Amylopectin, the storage polysaccharide of the coccidia *Eimeria brunetti* and *E. tenella*. — *J. Parasitol.*, 1969, vol. 55, p. 839—845.

LIFE CYCLE AND CYTOCHEMICAL STUDY
OF THE ENDOGENOUS STAGES OF *EIMERIA AKERIANA*
(COCCIDIIDA, EIMERIIDAE) FROM *MERIONES BLACKLERI*

M. A. Musajev, S. G. Ismailov, G. D. Gaibova

S U M M A R Y

Three generations of schizonts in the life cycle of *Eimeria akeriana*, the intestinal parasite of *Meriones blackleri*, were determined. Gametogony begins in 94 hours, the first oocysts discharge in 5.5—6 days and lasts 14.5 to 15 days after the oocyst administration. A cytochemical study of the distribution of the nucleic acids, proteins and amylopectin at the stages of endogenous development of *E. akeriana* has revealed a considerable similarity among the parasites of *Eimeria* though each type is characterized by some cytochemical peculiarities.
