

УДК 576.893.12 : 576.31

## МОРФОЛОГИЯ ВНУТРИЯДЕРНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ ТРОФОЗОИТОВ ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Ю. В. Чернов, Т. В. Акимова, Л. М. Гордеева, Т. В. Продеус

По электронно-микроскопическим данным, внутриядерные включения есть не у всех особей одного штамма дизентерийной амебы; их общее количество неодинаково в разных штаммах. Внешний слой некоторых внутриядерных включений содержит нить (или нити) кольцевой формы, обернутую вокруг центральной зоны включения. Толщина нити около 9 нм. Предполагается, что динамическая структура внутриядерных включений отражает транскрипцию внехромосомной, кольцевой, экзогенной ДНК.

Всеми, кто изучал ультраструктуру вегетативных форм *Entamoeba histolytica* и обращал внимание на строение ядра амебы, были отмечены внутриядерные включения (ВВ). В первых работах их описывали как агрегаты из гранул (Miller e. a., 1961), позже они получили название «пуговицеподобных тел» (Ludvik, Shipstone, 1970).

Подобные сферические ВВ были обнаружены у амеб от больных амебиазом и от экспериментально зараженных животных (из абсцессов печени хомяков), а также из культур, поддерживаемых в разных условиях (Rosenbaum, Wittner, 1970; Feria-Velasco, Trevino, 1972; Conzales-Angulo e. a., 1973; Авакян, 1975; Silard e. a., 1981).

Мы провели электронно-микроскопическое исследование ВВ амеб двух штаммов, стараясь приблизиться к пониманию природы этих включений.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электронно-микроскопически изучались трофозоиты дизентерийной амебы двух штаммов, выделенных из больного и содержащихся в поликсенической культуре на среде Павловой: штамм «К» выделен в 1952 г., штамм «БН» — в 1968 г. Трофозоиты фиксировались 2%-ным глутаровым альдегидом на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2) 1 ч, затем 1%-ной тетраокисью осмия на том же буфере 1; обезвоживались в спиртах восходящей концентрации и через абсолютный ацетон заливались в эпон. Ультратонкие срезы контрастировались уранилацетатом и цитратом свинца, просматривались в электронном микроскопе ЭМВ-100 А.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутриядерные включения (ВВ) обнаруживаются во внешнем слое ядра амебы как осмиофильные образования неравномерной плотности. Они не встречаются в центральной зоне ядра или в непосредственном контакте с ядерной оболочкой. На срезах ВВ всегда округлой формы (рис. 1). Это позволяет считать, что в действительности они имеют форму, близкую к сферической. Диаметр ВВ на срезах колеблется от 0.1 до 0.5 мкм, средний — 0.2 мкм. Если в срез попадает меньший сегмент сферы ВВ, его нельзя отличить от обособленного участка периферического хроматина ядра амебы. Количество ВВ в ядрах отдельных особей двух исследованных штаммов различно. У 30 амеб штамма «К» обнаружено лишь одно ВВ, а при изучении 37 особей штамма «БН» ВВ обнаружены в 60% срезов ядер. На одном срезе встречалось до 7 ВВ, в среднем — 2. Анализ

серийных срезов ядер амёб штамма «БН» показал, что у значительной части особей ВВ отсутствуют. ВВ обнаруживаются в ядрах и с кариосомой, и без нее, при хорошо выраженном периферическом хроматине, и в ядрах, где перифери-

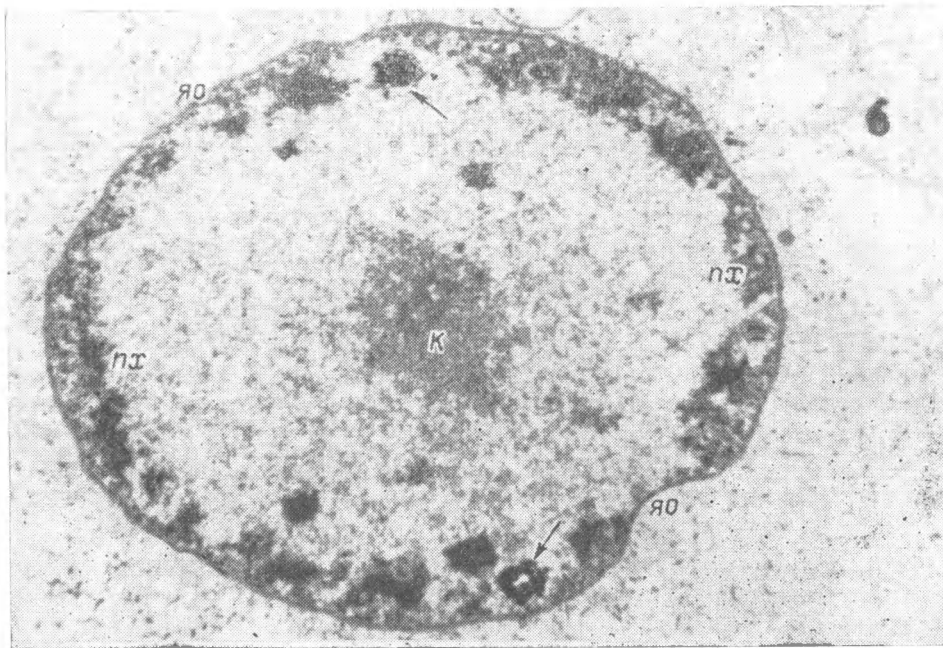


Рис. 1. Ядро трофозойта дизентерийной амёбы с двумя внутриядерными включениями (стрелка). К — кариосома, пх — периферический хроматин, яо — ядерная оболочка. Ув. 11 000.

ческий хроматин выражен слабо. Часто ВВ расположены около внутриядерных везикул, которые есть у большинства амёб обоих штаммов. Сфера ВВ может соприкасаться с отдельной везикулой или пересекаться с ней.

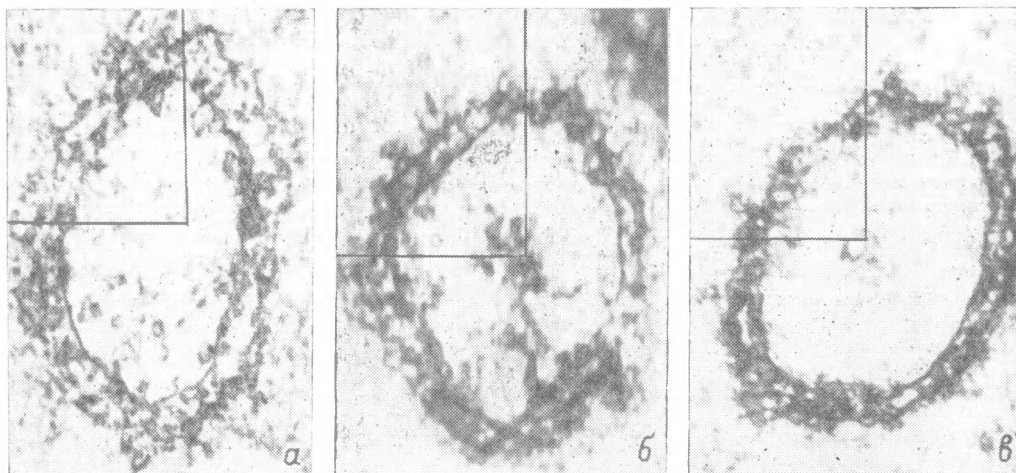


Рис. 2. Три последовательных среза через сферу внутриядерного включения дизентерийной амёбы. В выделенном секторе видно две нити (б); на других срезах (а, в) в этом секторе нити отсутствуют. Ув. 100 000.

ВВ имеют сложную структуру. Внутренняя зона включения низкой электронооптической плотности. Однако в ней может содержаться электроноплотный материал в виде мелких гранул, аморфных пятен или коротких цепочек из гранул. Такой же материал сосредоточен во внешней зоне ВВ. Количество электроноплотного материала, образующего наружный слой ВВ, бывает разным.

Чаще всего этот слой настолько плотный, что рассмотреть его внутреннюю структуру не удастся. В тех случаях, когда плотность слоя невелика, в его составе можно выявить нитевидный компонент. Толщина этих нитей (или нити) около 9 нм. На серийных срезах удастся увидеть, что отдельные отрезки составляют нить кольцевой формы, которая в неопределенном порядке обернута вокруг центральной зоны ВВ. На рис. 2 представлены фотографии трех последовательных срезов одного из ВВ, у которого наружный электронноплотный слой практически отсутствует. В выделенном секторе на рис. 2, б видны участки двух параллельных нитей, которые отсутствуют в этом же секторе на предыдущем и последующем срезах. Представленное на рис. 2 ВВ единственное, в составе которого обнаружены участки двух нитей одинаковой толщины, лежащие параллельно и на небольшом расстоянии друг от друга.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе сообщения о строении и свойствах ВВ дизентерийной амебы немногочисленны. Миллер с соавторами (Miller e. a., 1961), применив для фиксации перманганат калия, показали высокую электроннооптическую плотность некоторых ВВ, названных авторами гранулярными агрегатами. Эти данные свидетельствуют о присутствии в составе ВВ липопротеиновых комплексов. Фериа-Веласко и Тревино (Feria-Velasco, Trevino, 1972) обнаружили внутри отдельных ВВ кислую фосфатазу. На этом основании авторы предполагают, что структуры, подобные ВВ, являются элементами лизосомной системы амебы. Пинто да Сильва с соавторами (Pinto da Silva e. a., 1975) продемонстрировали электронноплотную метку по границе подобного включения в ядре амебы после обработки культуры комплексом конканавалин А-пероксидаза, примененного для выявления поверхностных рецепторов клетки. Факт обнаружения метки внутри ядра авторами не обсуждается. Приведенные литературные данные говорят, по нашему мнению, не только о неоднородности ВВ по составу, но и о возможном пути, по которому элементы фаголизосомной системы амебы проникают в ее ядро. Механизм проникновения неизвестен. Можно лишь предположить, что в ядре амебы происходят процессы, подобные эндоцитозу на плазматической мембране клетки (кариофагия). Присутствие внутриядерных везикул говорит в пользу такого предположения. В результате этих процессов в ядро могут попасть отдельные везикулы с лизосомными ферментами и рецепторы плазматической мембраны в составе пограничных мембран фагосом. Вероятно, этим же путем в ядро попадает часть фагоцитированного амебой материала и, в частности, чужеродная ДНК. Чувствительность структуры некоторых ВВ к действию ДНКазы показана в работах Гонзалес-Ангуло с соавторами (Gonzales-Angulo e. a., 1973) и Авакяна (1975). Обнаружение нами в составе ВВ кольцевых нитей толщиной около 9 нм подкрепляет предположение о существовании в ядре дизентерийной амебы внехромосомных кольцевых ДНК в виде дезоксирибонуклеопротеида. Диаметры всех ВВ близки. Учитывая разницу в расположении нитевидного компонента ВВ, можно предполагать, что длина кольцевых нитей примерно одинакова. Это довод в пользу эндогенного характера внехромосомных ДНК, возникающих, например, при амплификации определенной части собственного генома амебы. Однако некоторые факты свидетельствуют в пользу экзогенности этих ДНК: ВВ обнаруживаются только на периферии ядра, вблизи или в непосредственном контакте с внутриядерными везикулами, они присутствуют не во всех особях одного штамма и их количество в разных штаммах неодинаково.

Дайамонд и Маттерн (Diamond, Mattern, 1976) на основании данных Хруска и других (Hruska e. a., 1974) предполагали существование у дизентерийной амебы экзогенных внехромосомных ДНК в виде плазмид, но для культур, зараженных вирусом. Нам ни в одном из опытов не удалось обнаружить вирусоподобные частицы, описанные Дайамондом и соавторами как эндобионты дизентерийной амебы (Кеса, Терас, 1981). Поэтому мы не имеем оснований говорить о вирусной природе предполагаемой ДНК в составе ВВ.

Обнаружение в составе одного ВВ двух параллельных нитей на небольшом расстоянии друг от друга при отсутствии наружного электронноплотного слоя

может свидетельствовать о репликации ДНК ВВ. Разная степень выраженности у различных ВВ наружного слоя, состав которого морфологически не отличается от отдельных скоплений периферического хроматина ядра амебы (аналога ядрышка у других эукариот), дает основание предположить, что ДНК ВВ транскрибируется.

Данных о роли ВВ в биологии дизентерийной амебы практически нет. Людвиг и Шипстон (Ludvik, Shipstone, 1970) предположили, что это вирусоподобные симбионты, не представив этому никаких доказательств. Силард с соавторами (Silard e. a., 1981) обнаружили эти включения в ядрах амеб патогенного штамма и не нашли у амеб от бессимптомных носителей. С этой точки зрения интересно, что нами ВВ обнаружены у особей обоих исследованных штаммов, выделенных от больных. Однако в штамме «К», выделенном в 1952 г. и к настоящему времени полностью утратившем вирулентность, эти включения единичны, а в штамме «БН», культивируемом с 1968 г. и еще сохранившем способность заражать лабораторных животных, их значительно больше.

#### Л и т е р а т у р а

- А в а к я н А. А. Атлас анатомии простейших, патогенных для человека и животных. М. Медицина, 1975. 312 с.
- К е с а Л. Ю., Т е р а с Ю. Х. Вирусы простейших. — В кн.; Взаимоотношения простейших с вирусами. Протозоология. Вып. 6. Л., «Наука», 1981, с. 56—72.
- D i a m o n d L. S., M a t t e r n C. F. T. Protozoal viruses. — *Advances in virus research*, 1976, vol. 20, p. 87—112.
- F e r i a - V e l a s c o A., T r e v i n o N. The ultrastructure of trophozoites of *E. histolytica* with particular reference to spherical arrangements of osmiophilic cylindrical bodies. — *J. Protozool.*, 1972, vol. 19, p. 200—211.
- Н р у с к а J. L., M a t t e r n C. F. T., D i a m o n d L. S. Viruses of *Entamoeba histolytica*. IV. Studies on the nucleic acids of the filamentous and polyhedral viruses. — *J. Virol.*, 1974, vol. 13, p. 205—210.
- G o n z a l e s - A n g u l o A., R u i z d e C l a v e z I., T r e v i n o - G a r c i a M a n z o N. Ultrastructural study of intranuclear round bodies in *Entamoeba histolytica* after desoxyribonuclease and ribonuclease treatment. — *Arch. Invest. Med.*, 1973, vol. 4, suppl. 1, p. 25—33.
- L u d v i k J., S h i p s t o n e A. S. The ultrastructure of *Entamoeba histolytica*. — *Bull. Wld. Hlth Org.*, 1970, vol. 43, p. 301—308.
- M i l l e r J. H., S w a r t z w e l d e r J. C., D e a s J. E. An electron microscopic study of *Entamoeba histolytica*. — *J. Parasitol.*, 1961, vol. 47, p. 577—587.
- P i n t o d a S i l v a B., M a r t i n e z - P a l o m o A., G o n z a l e z - R o b l e s A. Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface; cap formation and microexudate. — *J. Cell Biol.*, 1975, vol. 64, p. 538—550.
- R o b e n b a u m R. M., W i t t n e r R. Ultrastructure of bacterized and exenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. — *J. Cell Biol.*, 1970, vol. 45, p. 367—382.
- S i l a r d R., K r o h m a l n i k G., S z o i c e s c u V., S t e r i n D. Comparative electron microscopic study of an imported pathogenic strain and an autochthonous nonpathogenic strain of *Entamoeba histolytica* with particular reference on nuclear inclusions. — *Arch. roum. Pathol. exp. Microbiol.*, 1981, vol. 40, p. 341—351.

ИМПитМ им. Е. И. Марциновского,  
Москва

Поступило 10 XI 1982

MORPHOLOGY OF INTRANUCLEAR INCLUSIONS OF ENTAMOEBA HISTOLYTICA  
TROPHOZOITES

Ju. V. Chernov, T. V. Akimova, L. M. Gordeeva, T. V. Prodeus

S U M M A R Y

Electron microscope studies of spherical intranuclear inclusions (II) of *Entamoeba histolytica* trophozoites of two strains, which were maintained in polyxenous culture for different periods of time, were carried out. Data on the number of II in different individuals and in different strains are given. The structure of II whose external layer consists of electron dense material and resembles morphologically peripheral chromatin of the ameba's nucleus, an analogy of nucleolus chromatin of cells of other eucariots, is considered.

Inside this layer some II have annular filaments about 9 nm thick rolled up spherically around the central zone of II.

Comparison of results obtained and literary data suggests that the dynamic structure of II in question reflects a number of biosynthetic processes on the basis of annular extrachromosomal DNA of exogenic origin.

---