

УЛЬТРАСТРУКТУРА СПОРОЗОИТА *EIMERIA ACERVULINA* (COCCIDIIDAE, EIMERIIDAE)

В. А. Кравцов

Всесоюзный научно-исследовательский институт по болезням птиц, Ленинград

Описывается ультратонкое строение эксцистированного *in vitro* спорозоида *E. acervulina*. Отмечено, что ветви комплекса роптрии-микронемы у спорозоида этого вида кокцидий в количественном отношении представлены беднее, чем у других видов. Характерно, что в свободном спорозоите *E. acervulina* отсутствуют гранулы амилопектина.

Eimeria acervulina — один из наиболее патогенных видов кокцидий кур. В плане эпизоотического он занимает место рядом с *E. tenella*. Изучение *E. acervulina* проводится уже не одно десятилетие, но лишь сравнительно недавно начато изучение ультратонкого строения этого вида (Lee a. Millard, 1971; Fernando, 1973, 1974; Michael, 1975).

Заражающей стадией возбудителей кокцидиозов являются спорозоиты. Всесторонняя информация об этой стадии необходима специалистам, занимающимся биологией кокцидий, а также разработкой мер борьбы и профилактики кокцидиозов. Однако по ряду причин, основной из которых является трудность получения свободных спорозоитов и манипуляций с ними, этот объект, и особенно его ультроструктура, изучен сравнительно мало. В связи с этим мы провели изучение ультратонкого строения спорозоида *E. acervulina*. Результаты этого изучения изложены в настоящем сообщении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования использован чистый штамм *E. acervulina*. Получение ооцист, споруляция и эксцистирование спорозоитов проведено по методу, описанному в работах Шибаловой (1968, 1969).

Перед фиксацией спорозоитов их центрифугировали в течение 5 мин. при 800 об./мин. Для фиксации использовали 3%-й глутаралдегид и 2%-ю четырехокись осмия на 0.1 М фосфатном буфере. Сразу после фиксации клетки контрастировали в насыщенном водном растворе уранилацетата. Обезвоживание клеток проводили в серии этилового спирта восходящей концентрации с последующей проводкой в абсолютном ацетоне, затем проводили заливку в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме BS 490 А фирмы Tesla и контрастировали цитратом свинца. Просмотр срезов и фотографирование проводили на электронных микроскопах BS 613 фирмы Tesla и УЭМВ-100К.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксцистированный спорозоит *E. acervulina* представляет собой продолговатую клетку, в которой имеется ряд присущих спорозоидам всех кокцидий специальных органелл: коноид, комплекс роптрии—микронемы, микропора, рефрактильные тела, субпелликулярные микротрубочки, полярное кольцо (рис. 1—10).

Оболочка спорозои́та состоит из трех элементарных мембран, две из которых, внутренние, тесно соприкасаются друг с другом, образуя внутренний слой (это отчетливо видно на рис. 5, 7, 9). Толщина каждой из этих мембран около 7.5 нм. Наружная элементарная мембрана отделена от внутреннего слоя пространством, ширина которого примерно 20 нм. Таким образом, толщина оболочки спорозои́та *E. acervulina* составляет в среднем 40 нм. У спорозои́тов, фиксированных в момент движения, все три мембраны оболочки образуют складки (рис. 3). На переднем конце спорозои́та внутренний мембранный слой оболочки образует полярное кольцо, к которому прикреплены субпелликулярные микротрубочки, имеющие типичное строение (рис. 4, 5). Внутри полярного кольца располагается коноид, который представляет собой усеченный конус, состоящий из 7—8 фибрилл диаметром приблизительно 30 нм. Над коноидом хорошо видны два преконоидальных кольца (рис. 3). На продольных срезах конои́да, внутри его, видны выводные протоки комплекса роптрии—микронемы. Крупные и мелкие ветви этой органеллы располагаются в цитоплазме ниже конои́да и простираются вплоть до ядра и даже ниже. У *E. acervulina* обнаружено два выводных протока этой органеллы, а самих ветвей (так называемых роптрий и микронем) у спорозои́та *E. acervulina* меньше, чем, например, у *E. tenella*.

В оболочке спорозои́та *E. acervulina* обнаружена микропора. На продольном срезе (рис. 7) видно, что это инвагинация участка наружной мембраны оболочки, вокруг которой внутренний мембранный слой образует кольцевидную структуру. На поперечном срезе микропора представляет собой два концентрических кольца (рис. 8). Ширина микропоры составляет приблизительно 200—250 нм, а глубина может варьировать.

Наиболее характерными органеллами спорозои́та являются парануклеарные (рефрактильные) тела. Их у *E. acervulina* два — переднее и заднее (рис. 1). Они имеют мелкозернистую осмиофильную структуру и не ограничены мембраной. В настоящее время известно, что эта органелла содержит запас питательных веществ.

Ядро спорозои́та покрыто двумя мембранами, которые не прилегают вплотную друг к другу, а образуют перинуклеарное пространство. Последнее особенно отчетливо видно на рис. 3, 10. По периферии ядра расположены крупные глыбки хроматина (рис. 2, 3, 10); в нуклеоплазме хроматин находится в виде мелких зерен. На поверхности ядра имеется инвагинация, в которой располагаются структуры аппарата Гольджи (рис. 3, 10). На рис. 3 видно, что эти структуры образуются на наружной мембране ядра.

В цитоплазме спорозои́та всегда обнаруживаются 2—3 характерные для простейших митохондрии с тубулярными кристами. Кроме того, вещество цитоплазмы спорозои́та содержит цистерны эндоплазматической сети, рибосомы. Гранулы амилопектина мы обнаружили лишь в спорозои́тах, находящихся в спороцистах. В свободных спорозои́тах *E. acervulina* мы не нашли амилопектина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ультратонкая организация спорозои́тов *E. acervulina* не имеет принципиальных отличий от таковой других видов кокцидий. Имевшиеся в недавнем прошлом разногласия авторов по поводу строения и функций различных органелл кокцидий в настоящее время почти отсутствуют. Так, сейчас уже нет сомнений в том, что стенка спорозои́та и мерозои́та изученных видов кокцидий состоит из трех мембран. Толщина ее составляет примерно 40 нм (Roberts et al., 1970, 1971; Dubremetz, 1971; Шибалова, 1974; Шибалова с соавт., 1974). Это еще раз подтвердили исследования ультратонкого строения *E. acervulina*. Нет разногласий у исследователей в отношении толкования функций микропоры, конои́да.

Однако структура некоторых органелл, а также их видовое отличие интерпретируются по-разному. В частности, имеются в виду роптрии и

микронемы. Большинство авторов считает эти образования различными органеллами. Однако Хеллер (Heller, 1972) показал, что роптрии и микронемы являются ветвями одной разветвленной органеллы. В наших более ранних исследованиях этих структур у *E. tenella* (Шибалова с соавт., 1975) было установлено, что роптрии и микронемы — это обозначения разного функционального состояния одних и тех же структур. Эти данные подтвердились и у спорозоитов *E. acervulina*. Шолтысек с соавторами (Scholtyseck et al., 1973) склонны придавать этой органелле роль признака, который может быть использован в систематике.

Интересен, по нашему мнению, тот факт, что в свободном (эксцистированном) спорозоите *E. acervulina* отсутствуют гранулы амилопектина. Можно предположить, что у этого вида кокцидий амилопектин используется полностью во время спорогонии.

Спорозоит как заражающая стадия является как раз тем объектом, который в первую очередь вызывает так называемую «реакцию тревоги» организма (Schole, Dey-Harza, Harisch, Enigk, 1972). Последняя, как справедливо утверждают Шоле и соавторы, и является причиной экономических потерь при вспышках кокцидиозов. Конечно, можно считать спорным вопрос о том, что же является первопричиной этих потерь, однако ясно, что обе причины (спорозоит и «реакция тревоги») нельзя рассматривать отдельно. В этом плане детальное изучение заражающей стадии (в том числе и ее ультраструктуры), а также изучение изменений в организме-хозяине, необходимы для понимания сущности этой «реакции» и для направленного ее регулирования.

Л и т е р а т у р а

- Ш и б а л о в а Т. А. 1968. Об эксцистировании спорозоитов *Eimeria tenella* in vitro. *Паразитолог.*, 11 (4) : 372—374.
- Ш и б а л о в а Т. А. 1969. Культивирование стадий бесполой фазы жизненного цикла *Eimeria tenella* в культурах клеток. *Цитолог.*, 11 (6) : 707—713.
- Ш и б а л о в а Т. А. (Shibalova T. A.) 1974. Electron microscope observations on the development of *Eimeria tenella* (Sporozoa, Coccidia) in tissue culture. I. The fine structure of the sporozoite. *Acta Protozoolog.*, 12 (26) : 313—318.
- Ш и б а л о в а Т. А., М о р о з о в а Т. И. и К р а в ц о в В. А. 1974. Ультраструктура спорозоитов и мерозоитов *Eimeria tenella*. *Паразитолог.*, 8 (3) : 266—271.
- Ш и б а л о в а Т. А., М о р о з о в а Т. И. и К р а в ц о в В. А. 1975. О соотношении роптрий и микронем у *Eimeria tenella* (Sporozoa, Coccidia). *Acta Protozoolog.*, XIII : 371—379.
- D u b r e m e t z M. J.—F. 1971. Le conoide et les microtubules sous-pelliculaires du merozoite d'*Eimeria necatrix* (Sporozoaire Coccidiomorphe); etude au microscope electronique. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 272 : 600—603.
- F e r n a n d o M. A. 1973. Fine structural changes associated with microgametogenesis of *Eimeria acervulina* in chickens. *Z. Parasitenk.*, 43 (1) : 33—42.
- F e r n a n d o M. A. 1974. Fine structure of the schizonts and merozoites of *Eimeria acervulina* in the chicken. *J. Parasitolog.*, 60 (1) : 149—159.
- H e l l e r Y. 1972. Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Bildung und Struktur von Conoid, Phoptrien und Mikronemen bei *Eimeria stiedae* (Sporozoa, Coccidia). *Protostolog.*, 8 (1) : 43—51.
- L e e D. L. and M i l l a r d B. J. 1971. The structure and development of the macrogamete and oocyst of *Eimeria acervulina*. *Parasitolog.*, 62 : 31—34.
- M i c h a e l E. 1975. Structure and mode of function of the macrogametes of *Eimeria acervulina*. *J. Parasitenk.*, 45 (4) : 347—361.
- R o b e r t s W. L., H a m m o n d D. M. and S p e e r C. A. 1970. Ultrastructural study of intra — and extracellular sporozoites of *E. callospermophili*. *J. Parasitolog.*, 56 (5) : 907—917.
- R o b e r t s W. L., S p e e r C. A. and H a m m o n d D. M. 1971. Penetration of *Eimeria larimerensis* sporozoites into cultured cells as observed with the light and electron microscopes. *J. Parasitolog.*, 57 (3) : 615—625.
- S c h o l t y s e c k E., M e h l h o r n H. und M ü l l e r E. G. 1973. Identifikation von Merozoiten der vier cystenbildenden Coccidien (*Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Frenkelia*) auf Grund feinstruktureller Kriterien. *Z. Parasitenk.*, 42 : 185—206.
- S c h o l e J., D e y - H a z r a A., H a r i s c h G., E n i g k K. 1972. Zur Pathogenität der Coccidien des Huhnes. *Z. Parasitenk.*, 38 : 3—13.

THE FINE STRUCTURE OF EIMERIA ACERVULINA SPOROZOITES

V. A. Kravtsov

S U M M A R Y

The fine structure of *E. acervulina* sporozoite excysted in vitro is described. It was found that quantitative characteristics of the rophries-micronemes complex in sporozoite of this species is lower than that of other species. It is noteworthy that free sporozoite of *E. acervulina* has no amylopectin granules.

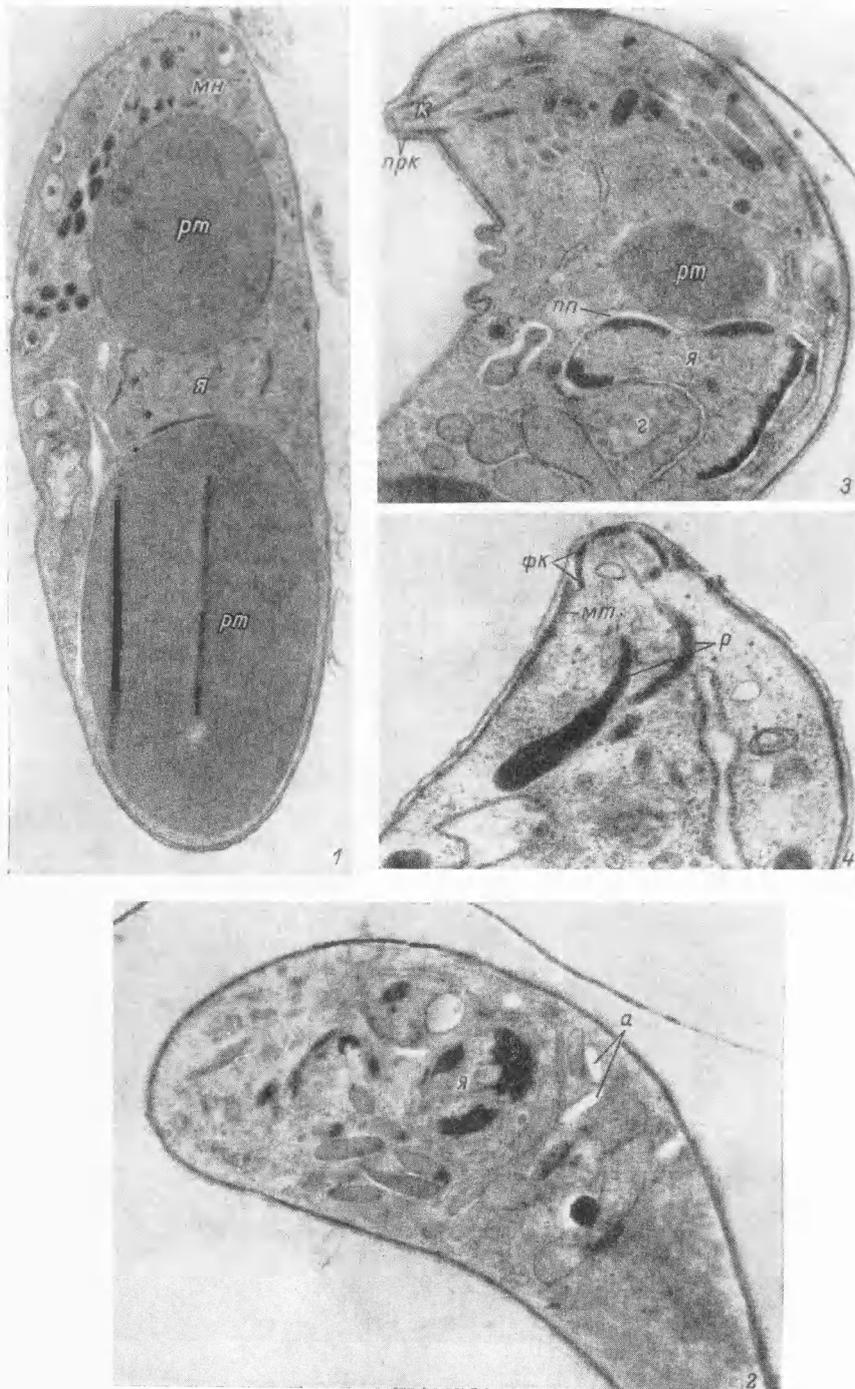


Рис. 1—4. Ультраструктура спорозонта *E. acervulina*.

1 — продольный срез спорозонта; 2 — спорозонт в спороцисте; 3, 4 — апикальный конец спорозонта. Увел.: 1 — 18 000; 2 — 20 000; 3 — 30 000; 4 — 34 000. а — амилопектин; з — комплекс Гольджи; к — коноид; мт — субпелликулярные микротрубочки; мн — микронемы; р — роптрии; рт — рефрактивное тело; пн — перинуклеарное пространство; прк — преконоидальные кольца; фк — фибриллы коноида; я — ядро.

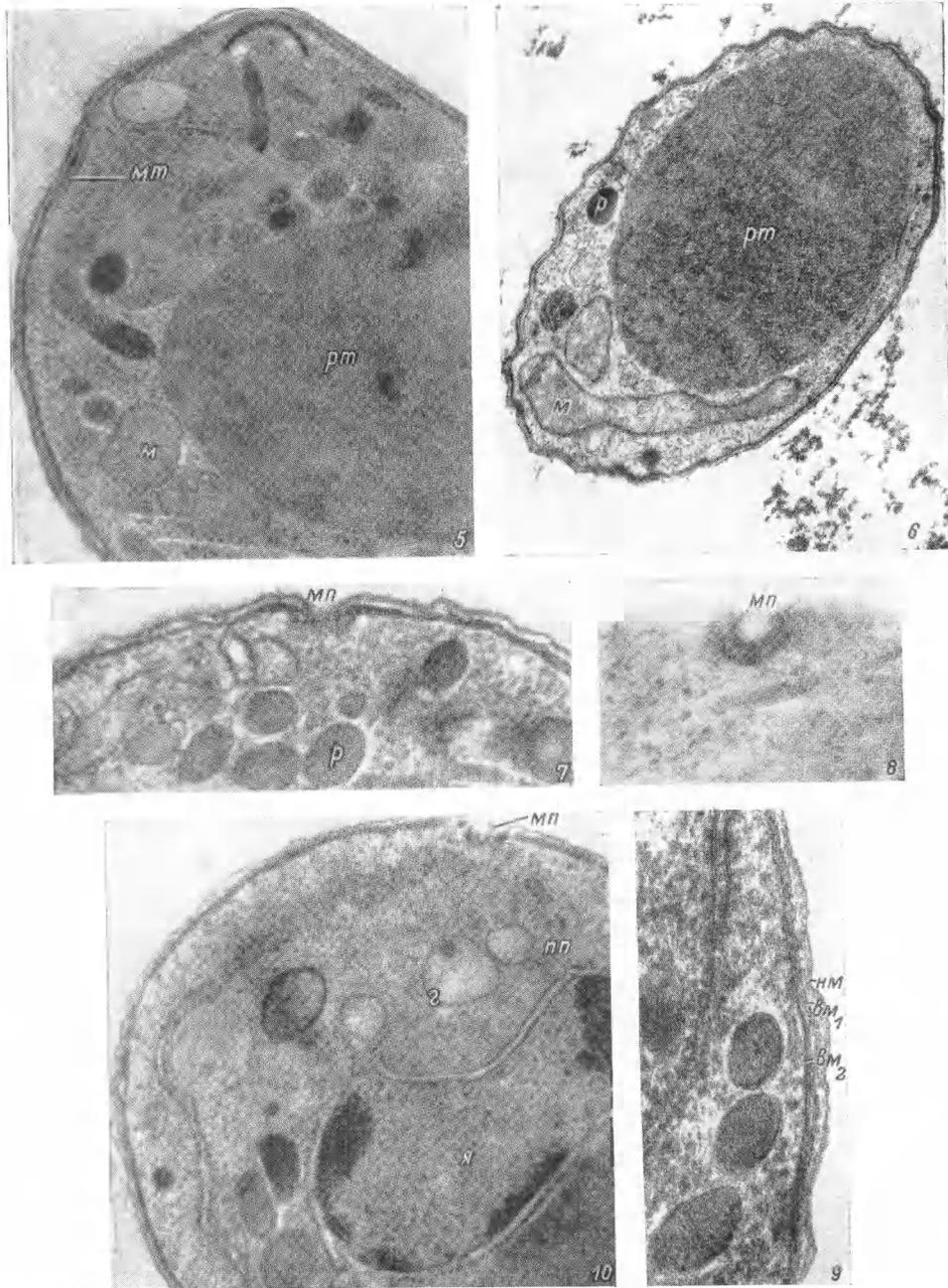


Рис. 5—10. Ультраструктура спорозоида *E. acervulina*.

5 — апикальный конец спорозоида; 6 — поперечный срез спорозоида; 7, 8, 10 — фрагменты спорозоида с микропорой; 9 — фрагмент пелликулы спорозоида. Увел.: 5 — 37 000×; 6 — 28 000×; 7, 8 — 69 000×; 9 — 100 000×; 10 — 35 000×. м — митохондрия; mp — микропора; nm — наружная мембрана; sm₁ — первая внутренняя мембрана; sm₂ — вторая внутренняя мембрана. Остальные обозначения такие же, как и на рис. 1—4.