

УДК 576.893.161.13

**ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЖГУТИКОНОСЦЕВ *LEPTOMONAS JACULUM* ИЗ СРЕДНЕЙ КИШКИ
КЛОПА *NEPA CINEREA***

А. О. Фролов, С. О. Скарлато

В средней кишке *Nepa cinerea* электронно-микроскопически исследованы прикрепленные к эпителию и лежащие свободно в просвете пищеварительного тракта жгутиконосцы *Leptomonas jaculum*. Показано, что прикрепление *L. jaculum* к эпителиальной клетке происходит за счет сильно расширенного отдела жгутика, образующего на своей поверхности выросты неправильной формы. Расширенный жгутик может формировать обширную полудесмосому с плазматической мембраной эпителиальной клетки, десмосомоподобные контакты с плазмалеммой переднего конца тела самого жгутиконосца и отдельные десмосомы с расширенными жгутиками соседних особей. У прикрепленного паразита жгутик содержит короткую аксому, рыхлый фибриллярный внутрижгутиковый матрикс и не имеет параксиального тяжа. У свободнолежащих особей *L. jaculum* жгутик имеет обычную форму и строение (без расширений и выростов), а также содержит параксиальный тяж. Описаны тонкое строение ядра, комплекса кинетопласт—митохондрия, аппарата Гольджи, гликосом, липидных включений, мультимембранных образований и ряда других структур у *L. jaculum*.

Жгутиконосцы *Leptomonas jaculum* (сем. Trypanosomatidae) были впервые описаны из кишечника водяного скорпиона *Nepa cinerea* (сем. Nepidae) в 1902 г. во Франции (Léger, 1902a). Впоследствии этот вид неоднократно обнаруживался в клопах *N. cinerea* и *Ranatra linearis* в различных странах Европы (Wallace, 1966). На территории СССР *L. jaculum* ранее не отмечался. *L. jaculum* относится к немногочисленной группе «надежных» видов низших трипаносоматид, реальность существования и систематическая принадлежность которых не вызывает сомнений. Этим во многом определяется ценность *L. jaculum* как объекта исследований. Методами световой микроскопии морфология и жизненный цикл *L. jaculum* уже исследованы (Léger, 1902a, 1902b; Porter, 1910). В частности, Леже (Léger, 1902b) описал локализацию *L. jaculum* на поверхности кишечного эпителия *N. cinerea*. По его наблюдениям эти жгутиконосцы несут на своем переднем конце образование, напоминающее протомерит грегаринов. Такие формы Леже назвал грегариноподобными. Однако предложенный им термин, хотя и употребляется в современной литературе, широкого распространения не получил. Чаще таких жгутиконосцев называют формами, локализующимися на поверхности кишечного эпителия, или прикрепленными формами. Изучению прикрепленных и неприкрепленных форм *L. jaculum* и посвящена предлагаемая работа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Жгутиконосцы *Leptomonas jaculum* изучены в средней кишке клопов *Nepa cinerea*. Зараженных клопов собирали на территории Ленинградской и Псковской обл. Светооптически изучение *L. jaculum* проводили на мазках из пищеварительного тракта клопов, окрашенных по Романовскому—Гимза, и на сериях

парафиновых срезов средней кишки *N. cinerea*, окрашенных железным гематоксилином по Гейденгайну. Для исследования ультраструктуры *L. jaculum* кусочки зараженной средней кишки клопов фиксировали 3%-ным глутаральдегидом, постфиксировали 2%-ным OsO_4 , обезвоживали и заливали в смесь эпон с аралдитом по методике, описанной ранее (Фролов, Скарлато, 1987). Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB III и после контрастирования уранил-ацетатом и цитратом свинца исследовали в электронных микроскопах JEM 100C и JEM 100CX.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эпителий средней кишки *Nepa cinerea* сформирован крупными удлиненно-цилиндрическими клетками двух типов (рис. 1, 1; 2). Клетки первого типа, составляющие основную часть эпителия, обладают короткими микроворсинками. Цитоплазматическая сторона плазмалеммы последних выстлана частицами диаметром около 12 нм (рис. 1, 2, 3; 2, 1; 3), которые, по-видимому, соответствуют портам (Andries, Torgier, 1982). Вблизи плазмалеммы лежат цистерны гладкой эндоплазматической сети, а глубже — каналы шероховатого эндоплазматического ретикулума. Кроме того, клетки с микроворсинками имеют много митохондрий и электронноплотных гранул диаметром 0.15—0.4 мкм (рис. 1, 2; 3). Клетки второго типа почти полностью лишены микроворсинок (рис. 1, 2). В их цитоплазме преобладает гладкий эндоплазматический ретикулум, а количество митохондрий, свободных рибосом и электронноплотных гранул значительно меньше, чем у клеток первого типа.

Как правило, апикальная поверхность клеток обоих типов покрыта двумя параллельными мембранами — плазматической и дополнительной внеклеточной, расстояние между которыми составляет около 10 нм (рис. 2, 1; 3). Часто дополнительных мембран бывает несколько. В некоторых участках средней кишки внеклеточные мембранные образования могут полностью изолировать микроворсинки от просвета пищеварительного тракта.

Жгутиконосцы *L. jaculum* либо свободно располагаются в просвете средней кишки, либо прикрепляются к поверхности всасывающего эпителия *N. cinerea*. Кроме того, в кишечнике водяного скорпиона были обнаружены жгутиконосцы, соединенные своими передними концами в розетки. Особенности строения паразитов, составляющих розетки, в настоящей статье не рассматриваются. В случае высокой зараженности клопов-хозяев жгутиконосцы полностью покрывают эпителий средней кишки (рис. 1, 1). На ранних же этапах заражения паразиты локализируются на поверхности кишечных клеток поодиночке или небольшими группами (рис. 1, 3). Промастиготы *L. jaculum* могут с одинаковым успехом прикрепляться к эпителиальным клеткам обоих типов, если они не покрыты внеклеточными мембранными образованиями. Прикрепление *L. jaculum* к стенке кишечника происходит за счет сильно расширенных жгутиков (рис. 1, 3; 2, 1; 3). По терминологии Леже (Léger, 1902b), прикрепленные таким образом жгутиконосцы и представляют собой «грегариноподобные формы». Поверхность расширенного жгутика, обращенная к эпителиальным клеткам, образует выросты неправильной формы (рис. 1, 3; 2, 1; 3). Эти выросты нередко глубоко внедряются между микроворсинками и/или охватывают последние (рис. 2, 1). Часто в зоне соединения жгутика с эпителиальными клетками первого типа микроворсинки прерывались или были частично редуцированы (рис. 1, 3). В таких зонах эпителиальные клетки покрыты лишь одной плазматической мембраной. В тесном контакте с плазматической мембраной кишечной клетки лежит плазмалемма расширенной части жгутика, несущая у своего внутреннего листка протяженный слой армирующего фибриллярного материала шириной 25—30 нм (рис. 1, 2; 2, 1; 3). Этот тип межклеточного соединения можно отнести к разряду зональных полудесмосом.

Обозначения такие же, как на рис. 1 и 2.

ЭК
 МВ
 ПО
 а
 ЭС
 д
 М
 П
 КП
 ЛС
 ас
 Я
 Яд
 ЭМ
 ЭПС
 МП
 ЭЗ
 пд
 з
 ПК
 МО
 р
 пт

Ядро *L. jaculum* диаметром около 2 мкм обычно имеет неправильную форму (рис. 2, 4; 3). Оно находится либо в центре, либо несколько сдвинуто к переднему концу клетки. Одно крупное ядрышко лежит немного эксцентрично. Хроматин интерфазных ядер, как правило, прилегает к внутренней мембране ядерной оболочки, однако может образовывать и не связанные с оболочкой скопления. Наружная ядерная мембрана связана с немногочисленными цистернами эндоплазматического ретикулума. Основная масса рибосом лежит свободно в цитоплазматическом матриксе (рис. 2, 4). Часть рибосом прикреплена к мембранам ядерной оболочки и эндоплазматического ретикулума. Комплекс

Гольджи расположен между ядром и кинетопластом (рис. 2, 4; 3). Нередко в цитоплазме паразитов встречались мультимембранные образования (рис. 2, 4). Обнаружена связь этих образований с цистернами аппарата Гольджи, оболочкой митохондрии (рис. 2, 4), капсулой кинетопласта и плазмалеммой жгутикового кармана.

В цитоплазме *L. jaculum* выявлено три типа включений. Включения первого типа, диаметром около 0.3 мкм, имеют округлую или овальную форму, ограничены одной мембраной и содержат плотный гомогенный материал (рис. 2, 4). Эти включения имеют структуру, подобную микротельцам (гликосомам) других трипаносоматид. Включения второго типа представляют собой липидные капли средней плотности, диаметром около 0.5 мкм (рис. 2, 4). Основная их масса сосредоточена в задней части клетки. Наконец, включения третьего типа представлены пузырьками диаметром около 0.25 мкм, также ограниченными одной мембраной, но содержащими материал низкой электронной плотности (рис. 2, 4). По-видимому, эти пузырьки содержат нестабильные липиды, которые вымываются в ходе фиксации.

ОБСУЖДЕНИЕ

В средней кишке водяного скорпиона *Nepa cinerea* было обнаружено большое количество прикрепленных к эпителию и меньшее число лежащих свободно в просвете пищеварительного тракта жгутиконосцев *Leptomonas jaculum*. Тонкое строение обеих форм во многом сходно с таковым других трипаносоматид (Vickerman, Preston, 1976). Однако ультраструктура расширенных жгутиков «грегариноподобных форм» *L. jaculum* и образуемых ими специализированных клеточных контактов имеет ряд особенностей. На структуру и функции жгутика *L. jaculum* большое влияние оказывает строение средней кишки водяного скорпиона. Как и у других изученных клопов, перитрофическая оболочка у *N. cinerea* отсутствует. Показано, что апикальная поверхность средней кишки клопов (включая микроворсинки) обычно покрыта двумя мембранами, из которых внутренняя мембрана плазматическая, а наружная — дополнительная внеклеточная (Andries, Torpier, 1982). Нередко дополнительных мембран бывает несколько, и они формируют мощные слои внеклеточных мембранных образований. Большинство исследователей полагает, что внеклеточные мембранные образования клопов возникают в результате отслоения наружной из двух параллельных мембран, покрывающих микроворсинки (Tieszen e. a., 1986; Фролов, Скарлато, 1988). Однако недавно для *N. cinerea* было показано, что в образовании внеклеточных мембран принимают участие специфические электронноплотные гранулы эпителиальных клеток (Andries, Torpier, 1982).

Предположение о том, что внеклеточные мембранные образования клопов выполняют функции перитрофической оболочки, кажутся справедливыми. В частности, они могут защищать среднюю кишку клопов от паразитов. И действительно, *L. jaculum* прочно прикрепляются в средней кишке *N. cinerea* лишь в тех местах, где эпителиальные клетки покрыты только одной плазматической мембраной. У некоторых других видов клопов в зоне специализированных контактов с паразитами эпителиальные клетки также не содержат на своей поверхности дополнительных мембран (Tieszen e. a., 1983; 1986).

У прикрепленных *L. jaculum* жгутик после выхода из устья жгутикового кармана претерпевает значительные изменения. Он сильно расширяется, укорачивается, образует отростки, внедряющиеся между микроворсинками эпителиальных клеток, и теряет параксиальный тяж. По существу дистальная часть жгутика целиком преобразуется в специализированную органеллу прикрепления, которая на светооптическом уровне напоминает протомерит грега-

рин. В местах соединения расширенного жгутика *L. jaculum* с поверхностью эпителиальной клетки средней кишки *N. cinerea* микроворсинки обычно прерываются или редуцируются. Известно еще несколько случаев, когда в местах прикрепления трипаносоматид микроворсинки в щеточной каемке клеток хозяина отсутствовали. Это происходит при заякоривании *Trypanosoma rotatorium* на эпителии желудка пиявки *Batrachobdella picta* (Desser, 1976) и закрепления *Blastocrithidia gerridis* в средней кишке водомерки *Gerris odontogaster* (Tieszen e. a., 1983). Однако редукции микроворсинок, как правило, не происходит в случае закрепления большинства других изученных паразитических кинетопластид на эпителии со щеточной каемкой (Molyneux, 1977, 1983; Current, 1980; Tetley, Vickerman, 1985; Tieszen e. a., 1986).

По степени сложности можно выделить несколько типов взаимоотношений жгутиков трипаносоматид с эпителиями, покрытыми щеточной каемкой. Наиболее простым представляется вплетение ундулоподии жгутика в толщу микроворсинок. Такие взаимоотношения отмечены между *Leishmania mexicana amazonensis* и щеточной каемкой средней кишки *Litzomyia longipalpis* (Killick-Kendrick e. a., 1974), *Trypanosoma melophagium* и микроворсинками средней кишки *Melophagus ovinus* (Molyneux, 1977), *Herpetomonas ampelophilae* и микроворсинками средней кишки *Drosophila melanogaster* (Rowton e. a., 1981).

Более сложные отношения возникают, когда жгутик трипаносоматиды не просто вплетается между микроворсинками кишечного эпителия хозяина, а еще и содержит на своем конце локальное расширение с отростками. Подобная картина отмечена при заякоривании *Blastocrithidia miridarum* в средней кишке клопа *Adelphocoris quadripunctatus* (Фролов, Скарлато, 1988) и эпимастигот *Trypanosoma cobitis* в зобе пиявки *Hemiclepsis marginata* (Lewis, Ball, 1979). У *Blastocrithidia familiaris* расширяются, образуют отростки и вплетаются между микроворсинками не только концы, но и отдельные участки в середине жгутика (Tieszen e. a., 1986). У *Cryptobia* sp. в сперматеке улитки *Triadopsis multilineata* (Current, 1980) и у эпимастигот *Trypanosoma brucei* в слюнной железе мухи це-це (Tetley, Vickerman, 1985) жгутики расширяются и формируют протяженные участки с многочисленными выростами жгутиковой мембраны, внедряющимися в щеточную каемку указанных органов.

Наконец, у прикрепленных форм *L. jaculum* весь отдел жгутика, что находится вне жгутикового кармана, сильно расширяется и укорачивается. При этом утрачивается упорядоченный параксиальный тяж. Аналогичные изменения происходят со жгутиками прикрепленных промастигот *Herpetomonas ampelophilae* в мальпигиевых сосудах *Drosophila melanogaster* (Rowton e. a., 1981). Таким образом, хотя жгутики у простейших представляют собой в первую очередь органеллы движения, у большинства паразитических кинетопластид на некоторых стадиях жизненного цикла они преобразуются в совершенные органы прикрепления. Причем, если незначительно расширенные жгутики еще могут обеспечивать направленное перемещение кинетопластид по органам беспозвоночного хозяина, то сильно расширенные жгутики к этому уже неспособны. К последнему типу как раз и относятся жгутики прикрепленных *L. jaculum*. По-видимому, условия существования *L. jaculum* в средней кишке *N. cinerea* требуют особенно прочного прикрепления для эффективного питания и размножения паразита.

Кроме того, удержанию трипаносоматид в кишечнике хозяев способствует образование специализированных контактов: полудесмосом и десмосом. Жгутики трипаносоматид образуют полудесмосомы преимущественно с кутикулярными выстилками пищеварительного тракта беспозвоночных (Molyneux, 1977, 1983). Однако жгутики *L. jaculum* и еще нескольких видов трипаносоматид (Desser, 1976; Tetley, Vickerman, 1985) формируют полудесмосомы с плазматическими мембранами эпителиальных клеток, несущих щеточную каемку.

Обширные полудесмосомы обнаружены, наряду с *L. jaculum*, у *Trypanosoma rotatorium* при соединении их жгутиков с эпителием желудка пиявки *Batrachobdella picta* (Desser, 1976). Большинство других изученных трипаносоматид крепится к микроворсинкам без формирования каких-либо специализированных контактов (Molyneux, 1983; Tieszen et al., 1986).

В заключение отметим, что расширенные жгутики *L. jaculum* образуют десмосомоподобные контакты с плазмалеммой переднего конца тела самих жгутиконосцев и отдельные десмосомы с расширенными жгутиками соседних особей. Десмосомоподобные контакты жгутиков с мембранами устья жгутикового кармана и передним концом тела клетки представляют собой обычное для трипаносоматид явление (Brooker, 1970; Desser, 1976, и др.). Специализированные контакты между жгутиками соседних особей этих паразитов также известны, но у небольшого числа видов (Brooker, 1970; Vickerman, 1973; Tieszen et al., 1983).

Л и т е р а т у р а

- Фролов А. О., Скарлато С. О. Свето- и электронно-микроскопические исследования *Leptomonas pyrrocoris* Z. (Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 1. С. 3—9.
- Фролов А. О., Скарлато С. О. Локализация и способы закрепления жгутиконосцев *Blastocrithidia miridarum* (Trypanosomatidae) в пищеварительном тракте клопов *Adelphocoris quadripunctatus* (Miridae) // Паразитология. 1988. Т. 22, вып. 6. С. 481—487.
- Andries J. C., Torpier G. An extracellular brush border coat of lipid membranes in the midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis // Biol. Cell. 1982. Vol. 46, N 2. P. 195—202.
- Brooker B. E. Desmosomes and hemidesmosomes in the flagellate *Crithidia fasciculata* // Z. Zellforsch. 1970. Bd 105, H 2. S. 155—166.
- Current W. L. *Cryptobia* sp. in the snail *Triadopsis multilineata* (Say): fine structure of attached flagellates and their mode of attachment to the spermatheca // J. Protozool. 1980. Vol. 27, N 3. P. 278—287.
- Desser S. S. The ultrastructure of the epimastigote stages of *Trypanosoma rotatorium* in the leech *Batrachobdella picta* // Can. J. Zool. 1976. Vol. 54, N 10. P. 1712—1723.
- Killick-Kendrick R., Molyneux D. H., Ashford R. W. Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly // Proc. R. Soc. Lond. (B). 1974. Vol. 187. P. 409—419.
- Léger L. Sur la structure et la mode de multiplication des flagelles du genre *Herpetomonas* Kent. // Compt. Rend. Soc. Biol. 1902a. T. 54. P. 398—400.
- Léger L. Sur la forme gregarinienne des *Herpetomonas* // Compt. Rend. Soc. Biol. 1902b. T. 54. P. 400—401.
- Lewis J. W., Ball S. J. Attachment of the epimastigotes of *Trypanosoma cobitis* (Mitrophanow, 1883) to the crop wall of the leech vector *Hemiclepsis marginata* // Z. Parasitenkd. 1979. Vol. 60, N 1. P. 29—36.
- Molyneux D. H. Vector-parasite relationships in the Trypanosomatidae // Adv. Parasitol. 1977. Vol. 15. P. 1—82.
- Molyneux D. H. Host-parasite relationships of Trypanosomatidae in vectors // Current topics in vector research. Vol. 1. N. Y. Praeger Publications, 1983. P. 117—148.
- Porter A. The life-cycle of *Herpetomonas jaculum* (Léger) parasitic in the alimentary tract of *Nepa cinerea* // Parasitology. 1910. Vol. 2. P. 367—391.
- Rowton E. D., Lushbaugh W. B., McGhee R. B. Ultrastructure of the flagellar apparatus and attachment of *Herpetomonas ampelophilae* in the gut and malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* // J. Protozool. 1981. Vol. 28, N 3. P. 297—301.
- Tetley L., Vickerman K. Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host — parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. // J. Cell Sci. 1985. Vol. 74. P. 1—19.
- Tieszen K., Heywood P., Molyneux D. H. Ultrastructure and host — parasite association of *Blastocrithidia gerridis* in the ventriculus of *Gerris odontogaster* (Gerridae: Hemiptera) // Can. J. Zool. 1983. Vol. 61, N 8. P. 1900—1909.
- Tieszen K. L., Molyneux D. H., Abdel-Hafez S. K. Host — parasite relationships of *Blastocrithidia familiaris* in *Lygaeus pandurus* Scop. (Hemiptera: Lygaeidae) // Parasitology. 1986. Vol. 92. Pt. 1. P. 1—12.
- Vickerman K. The mode of attachment of *Trypanosoma vivax* in the proboscis of the tsetse fly *Glossina fuscipes*: an ultrastructural study of the epimastigote stage of the trypanosome // J. Protozool. 1973. Vol. 20, N 3. P. 394—404.

Vickerman K., Preston T. M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates // Biology of the Kinetoplastida. London, N. Y., San Francisco: Acad. Press, 1976. P. 35—130.
Wallace F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids // Exp. Parasitol. 1966. Vol. 18, N 1. P. 124—193.

ЗИН АН СССР,
Ленинград;
Институт цитологии АН СССР,
Ленинград

Поступила 5.12.1988

ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY OF THE FLAGELLATES LEPTOMONAS
JACULUM IN THE MIDGUT OF A HEMIPTERAN, NEPA CINEREA

A. O. Frolov, S. O. Skarlato

S U M M A R Y

In the midgut of *Nepa cinerea*, the flagellates *Leptomonas jaculum*, both attached to the epithelium and lying free in the lumen of the intestine, were studied. An electron microscopic study revealed that the attachment of *L. jaculum* to the epithelial cell was achieved through the strongly expanded flagellar sheath with irregular outgrowths on its surface. The expanded distal part of the flagellar sheath forms a continuous hemidesmosome with the plasma membrane of the epithelial cell, desmosome-like junctions with the plasmalemma of the parasite's anterior end and some desmosomes with expanded flagella of the adjacent specimens. The flagellum of attached *L. jaculum* contains a short axoneme, loose fibrillar intraflagellar matrix and lacks a paraxial rod. The flagellum of non-attached *L. jaculum* has usual form and structure (without enlargements and outgrowths) and is supported by a paraxial rod. The fine structure of the nucleus, the kinetoplast-mitochondrion complex, the Golgi apparatus, the glycosomes, the lipid inclusions, the multimembraned bodies, and some other cell components were studied in both attached and free *L. jaculum*.

Вклейка к ст. А. О. Фролова и др.

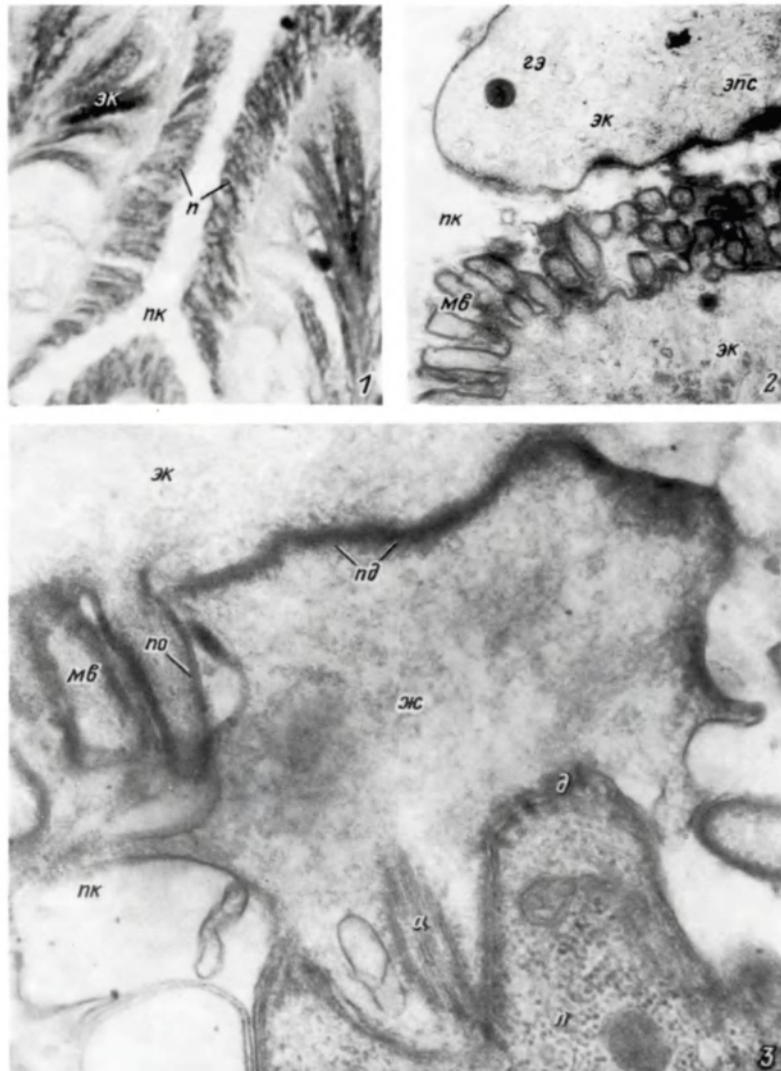


Рис. 1. *Leptomonas jaculum* в средней кишке *Nepa cinerea*.

1 — «бахрома» из паразитов (л) на поверхности эпителиальных клеток (эк); 2 — эпителиальные клетки с микроворсинками (мв) и без микроворсинок; 3 — соединение расширенного жгутика (ж) паразита с участком эпителиальной клетки, лишенной микроворсинок. а — аксонема; гз — плотные гранулы эпителиальных клеток; д — десмосома; лд — полудесмосома; лк — просвет кишки; ло — портасома; элс — эндоплазматическая сеть.

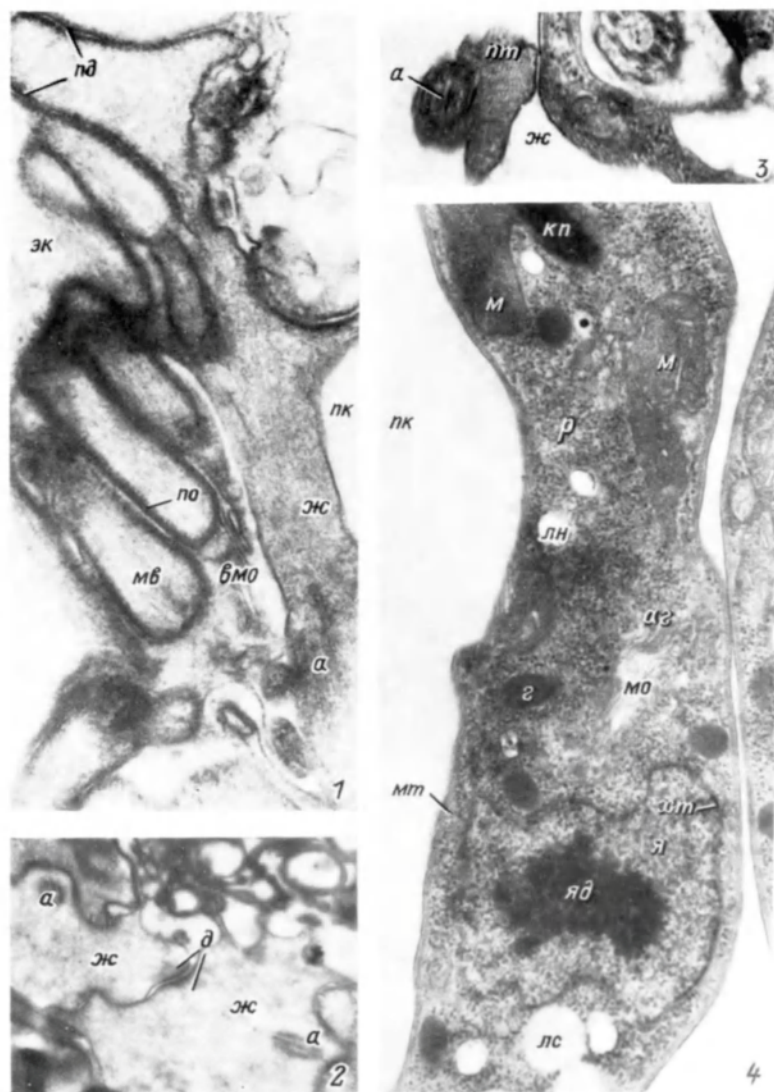


Рис. 2. *Leptomonas jaculum* в средней кишке *Nepa cinerea*.

1 — соединение расширенного жгутика паразита с эпителиальной клеткой; 2 — десмосома между двумя расширенными жгутиками; 3 — нерасширенная ундулиподия некрепленного паразита с параксиальным тяжем (пт); 4 — фрагменты двух клеток жгутиконосцев. аг — аппарат Гольджи; вмо — внеклеточные мембранные образования; г — гликосомы; кл — кинетопласт; лн — липидные включения низкой плотности; лс — липидные включения средней плотности; м — рукава митохондрии; мо — мультимембранное образование; мт — микротрубочки; р — рибосомы; хт — хроматин; я — ядро; яд — ядрышко. Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.