

УДК 576.893.161.13 : 577.11

© 1993

**ВИРУЛЕНТНОСТЬ  
И НЕКОТОРЫЕ ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
LEISHMANIA MAJOR  
В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

**Р. М. Насырова, В. Д. Каллиникова, С. Х. Вафакулов, Ф. Ш. Насыров**

На 17 штаммах *L. major*, выделенных от больных людей, выяснено, что описанный ранее морфогенез паразита в каждом пассаже культуры сопровождается цитохимическими преобразованиями промастигот: обеднением их клеток РНК, нарастанием дисперсности ее распределения в клетке, а также изменением активности НАДФ-Н-диафоразы, пероксидазы и ферментов, окисляющих янус зеленый Б.

Метациклические промастиготы, определяющие вирулентные свойства популяции лейшманий в культуре, имеют определенную цитохимическую характеристику. Их особенности — крайняя бедность РНК, ее дисперсность, низкая активность диафоразы, янус-окисляющих ферментов — могут отражать адаптацию промастигот к продолжению цикла в позвоночном хозяине.

Падение вирулентности от пассажа к пассажу в процессе длительного культивирования положительно коррелирует не только с постепенной утратой способности промастигот к метациклогу, но и со снижением диафоразной и пероксидазной активности всей популяции. Одновременное нарастание по мере культивирования янус-окисляющей способности промастигот может быть некоторой компенсацией снижения активности названных ферментов и отражать адаптацию к условиям культивирования, аттенуацию.

Исследования лейшманий в культурах позволили выяснить, что вирулентность этих паразитов изменяется на искусственной питательной среде как в пределах каждого пассажа, так и от пассажа к пассажу. Она связана с определенным типом промастигот — метациклическими формами, которые в каждом пассаже появляются в стационарной фазе (и тогда культура становится вирулентной), но от пассажа к пассажу становятся все малочисленнее, что коррелирует со снижением, а потом и с утратой вирулентности (Silva, Sacks, 1987; Насырова и др. 1988; Каллиникова и др., 1992).

Это дает возможность изучать изменения вирулентности лейшманий одновременно с изменениями цитохимических свойств паразитов и особо инвазивных метациклических промастигот.

Известно, что в культуре морфологические преобразования лейшманий, результатом которых являются метациклические формы, сопровождаются существенными изменениями базофилии клетки (Каллиникова и др., 1987а, 1987б; Насырова, Насыров, 1987), а важнейшие метаболические перестройки в полном жизненном цикле касаются прежде всего энергетического обмена (Brand, Johnson, 1947; Krassner, 1966; Janovy, 1967) и связанных с ним

хондриома и кинетопласта (Creemers, Jadin, 1967; Rudzinska e. a., 1964; Simpson, 1965). Протеазы (Wilson e. a., 1989; Chang, 1989), кислая фосфатаза (Katakura, Kobayashi, 1988), а также некоторые окислительные ферменты (Каллиникова, Насыров, 1972; Dogan, Herman, 1981; Chanon, Blackwell, 1985) подозреваются в прямом отношении к вирулентности лейшманий.

Основываясь на этих данных, свои цитохимические исследования *L. major* в процессе культивирования мы начали с РНК и окислительных ферментов.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

На среде NNN с обогащающейся жидкостью исследовались 17 штаммов, 14 из которых (МНОМ/SU/85/5, МНОМ/SU/85/8, МНОМ/SU/86/15МБ, МНОМ/SU/86/9МБ, МНОМ/SU/86/3МБ, МНОМ/SU/86/2МБ, МНОМ/SU/86/28Т, МНОМ/SU/86/4КБ, МНОМ/SU/87/3, МНОМ/SU/87/10, МНОМ/SU/87/13, МНОМ/SU/87/52Б, МНОМ/SU/87/54Т, МНОМ/SU/87/ЭПК) сразу после выделения (2—20-й пассажи) от больных людей в Узбекистане и отчасти в Туркмении в 1985—1987 гг., а 3 штамма (МНОМ/SU/81/КТ, МНОМ/SU/72/19Аш, МНОМ/SU/55/Белова)<sup>1</sup> — после очень длительного культивирования (32—503-й пассажи).

На разных этапах культивирования изучены степень вирулентности лейшманий для мышей, морфология промастигот в течение 30 дней пассажа и в отдельные дни (в большинстве случаев 5, 10, 15, 20, 30-й дни), их некоторые цитохимические характеристики. У промастигот цитохимически изучались: РНК по Браше; способность окислять янус зеленый Б; активность НАДФ-Н-диафоразы по Скарпелли и пероксидазы (бензидиновым методом). Степень активности ферментов выражалась средним числом гранул (выявляемых продуктов реакции в особи) из 50—100 просмотренных клеток. На основе исследования отдельных дней роста культуры вычислялась средняя степень активности фермента для пассажа.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Цитохимические изменения в пределах пассажа. Окраска метиловым зеленым-пиронином с контролем РНК-азой показала, что происходящая в каждом пассаже цитодифференцировка промастигот от темных к просветляющимся, светлым и метациклическим сопровождается постепенным обеднением клеток РНК. Она сопровождается и изменением формы цитохимического выявления РНК от гранулярно-глыбчатой у темных к зернистой у просветляющихся и совсем дисперсной у светлых и метациклических промастигот (см. таблицу). Уровень содержания РНК в цитоплазме положительно коррелирует с количеством кариосомной РНК. У бедных РНК светлых и метациклических форм кариосома не выявляется.

РНК нередко содержится и в кинетопласте. Это выражается в коричневатом или сиреневом его окрашивании. После предварительной обработки РНК-азой кинетопласт становится чисто зеленым. У метациклических промастигот РНК-содержащие кинетопласты встречаются, пожалуй, чаще, чем у других форм. И ядро, и даже кинетопласт бледно окрашиваются метиловым зеленым. Обеднение РНК и усиление ее дисперсности при переходе от темных к метациклическим промастиготам в каждом пассаже повторяются заново.

Сменяющие друг друга в пассаже морфологические типы промастигот *L. major* различаются также и по активности окислительных ферментов (см. таб-

<sup>1</sup> Далее названия штаммов даются в сокращении.

Некоторые цитохимические характеристики промастигот *L. major* в культуре  
Some cytochemical characters of *L. major* promastigotes in culture

Цитохимические реакции	Морфологические типы промастигот			
	темные	просветленные	светлые	метацикл
Браше (РНК)				
уровень содержания РНК в клетке	Много	Порядочно	Мало	Мало
форма выявления РНК	Гранулярно-глыбчатая	Зернистая	Дисперсная	Дисперсная
Активность НАДФ-Н-диафоразы	10—15	3	10—15	3
Активность пероксидазы	0—7	0—7	0—7	0
Способность окислять янус зеленый Б	15	15	15	2—3

лицу). Активность НАДФ-Н-диафоразы в виде зерен формазана обнаруживается главным образом в передней части клетки, вокруг кинетопласта, ядра и между ними. При высокой активности топография менее определена.

У темных и светлых промастигот активность НАДФ-Н-диафоразы значительна (10—15 гранул формазана на клетку), у просветляющихся и метациклических — низка (около 3 гранул) (см. таблицу).

Невысокая пероксидазная активность в виде золотисто-коричневых гранул числом не более 7 на клетку выявлялась в темных, просветляющихся и светлых промастиготах, которые в этой реакции без дополнительной окраски не всегда можно было четко различить. Активность проявляли не все особи. У метациклических форм она отсутствовала.

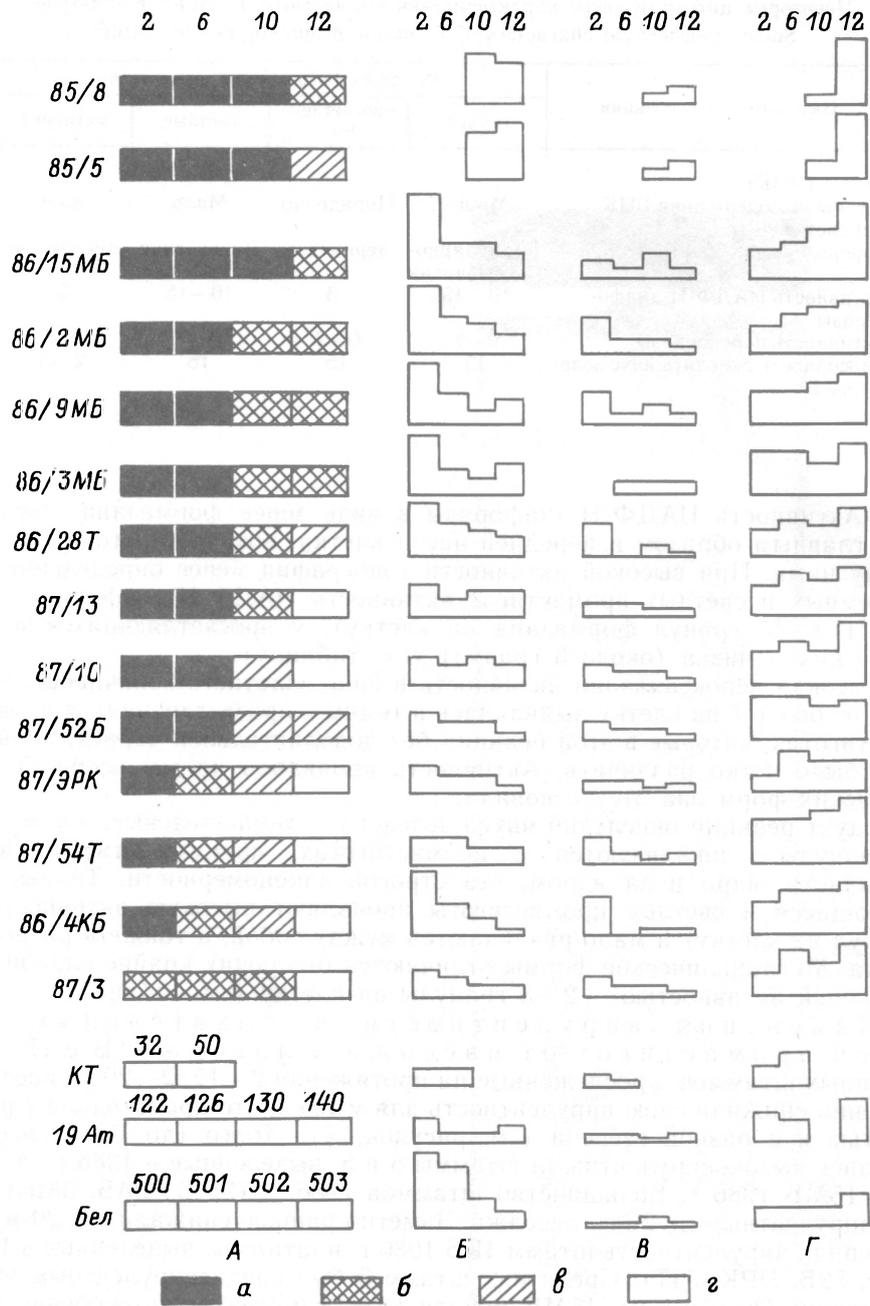
Продукт реакции окисления януса зеленого — темно-зеленые, часто обильные гранулы — локализируются в промастиготах, преимущественно вокруг кинетопласта, ядра и за ядром, без строгой закономерности. Темные, просветляющиеся и светлые промастиготы проявляют высокую активность (до 15 гранул на клетку) и мало различаются между собой, а также в разные дни пассажа. Метациклические формы отличаются от прочих крайне слабой янус-окисляющей активностью — 2—3 гранулы на клетку (см. таблицу).

2. Изменения вирулентности и дыхательных ферментов промастигот от пассажа к пассажи. Все 17 свежеселекционных штаммов, прослеженные на протяжении 2—12, 2—20-го пассажей, постепенно снижали свою вирулентность для мышей, что происходило с разной скоростью и в разной степени (см. рисунок, А). Долго (до 10-го пассажа) оставались высоковирулентными штаммы 5 и 8, выделенные в 1985 г., а также штамм 15МБ 1986 г. Большинство штаммов 1986 г. (9МБ, 2МБ, 3МБ) было средневирулентным до 20-го пассажа. Заметно раньше снижали и к 20-му пассажи теряли вирулентность штамм 4КБ 1986 г. и штаммы, выделенные в 1987 г. (13, 10, 52Б, ЭРК, 54Т). Среди них штамм 3 был средневирулентным уже на 2-м пассаже. Он и штамм 15МБ меняли свою вирулентность особенно постепенно: 1-й долго оставался средневирулентным, а 2-й — высоковирулентным.

Аттенуированные, с большим стажем культивирования, штаммы КТ, 19Аш и Белова на 32—503-м пассажах были невирулентными.

Наряду со снижением вирулентности от пассажа к пассажи наблюдались цитохимические изменения промастигот *L. major*, а именно их окислительных свойств (см. рисунок, А—Г).

Параллельно снижению вирулентности постепенно падала активность НАДФ-Н-диафоразы (см. рисунок, Б), что выражалось в сокращении числа



Вирулентность и дыхательные ферменты *L. major* на разных этапах культивирования. А — вирулентность: а — высокая, б — средняя, в — низкая, г — отсутствует; Б—Г — активность ферментов в промастиготах: Б — НАДФ·Н-диафораза, В — пероксидаза, Г — окисление януса зеленого Б (везде среднее число гранул — продуктов специфических цитохимических реакций — на клетку, для пассажа); цифры — номера пассажей после выделения штаммов из пациентов в культуру; слева — номера штаммов.

The *L. major* virulence and oxidative enzymes at the different stages of cultivation.

гранул формазана в клетке с 5—15 на 2-м пассаже до 1—5 гранул на 20-м пассаже [разница достоверна:  $\approx 3$ ;  $p < 0.01$  (см. рисунок, Б)].

Штаммы, выделенные в 1985—1986 гг. и долго остававшиеся вирулентными, начинали свое пребывание в культуре с более высокой диафоразной активностью (10—15 гранул формазана в клетке), чем штаммы 1987 г. (5 гранул), быстро утратившие вирулентность. Среди последних те, что дольше оставались высоковирулентными (штаммы 10 и 13), отличались слабыми изменениями диафоразной активности от пассажа к пассажи. То же можно сказать про штаммы 15МБ и 3, долго сохранявшие вирулентность на неизменном, хотя и разном, уровне.

Из старых, аттенуированных штаммов два характеризовались невысокой и мало изменяющейся активностью диафоразы, а третий — Белова — имел весьма высокую активность и, как свежесделанные штаммы, снижал ее от 500-го к 503-му пассажи (правда, он исследовался всего лишь в один из дней каждого пассажа).

Подобно диафоразной, в процессе длительного культивирования постепенно снижалась, а к 20-му пассажи практически утрачивалась пероксидазная активность промастигот (см. рисунок, В). В целом невысокая, она в начале культивирования была все же несколько выше у штаммов 1986 г., долго сохранявших свою вирулентность.

Крайне низкой была пероксидазная активность у старых, аттенуированных штаммов на 32—503-м пассажах.

В противоположность диафоразе и пероксидазе способность промастигот окислять янус зеленый Б нарастает в процессе длительного культивирования от 3—8 гранул в клетке — на 2-м, до 6—13 гранул — на 20-м пассажах (см. рисунок, Г). У штаммов 5 и 8 это нарастание было очень резким и совпадало с утратой высшей степени вирулентности. У штаммов 3МБ и 52Б, наоборот, янус-окисляющая способность изменялась по мере культивирования мало за счет того, что она была значительной на 2—6-м пассажах, после которых во втором случае вирулентность упала резко.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Цитохимические исследования лейшманий немногочисленны, фрагментарны и ни одно из них не охватывало динамику роста этих паразитов на искусственной питательной среде и не увязывало цитохимию промастигот с их цитодифференцировкой. Впервые проведенное на *L. major* такое исследование показало, что морфогенез лейшманий в культуре сопровождается серьезными изменениями РНК и окислительных ферментов.

Снижение базофилии — главное направление изменений лейшманий в пассаже — обусловлено постепенным обеднением промастигот РНК и нарастанием дисперсности ее цитохимического выявления. Прежние заключения о бедности этих паразитов РНК в культуре (Sen Gupta e. a., 1953; Хлгатын, 1965; Каллиникова, Насыров, 1972) оказываются верными лишь в отношении определенных типов промастигот, появляющихся с возрастом культуры; в начале пассажа лейшмании весьма богаты РНК, содержание которой снижается постепенно, достигая минимума у метациклических форм.

Без учета морфогенеза промастигот нельзя адекватно оценить и разрозненные старые данные о митохондриях, сукцинат-дегидрогеназе и окислении януса зеленого Б клетками *L. donovani* и *L. braziliensis* в культурах (Sen Gupta e. a., 1953; Guha e. a., 1956; Souza, Kothare, 1960; Chacravarty e. a., 1962). Четыре последовательно сменяющие друг друга в пассаже морфотипа промастигот нескольких изученных видов лейшманий (Каллиникова и др., 1987а, 1987б; И. А. Кобузева — личное сообщ.) различаются не только по содержа-

нию РНК, но и по активности определенных окислительных ферментов. Господствующими в начале пассажа темные формы наряду с богатством РНК обладают высокой янус-окисляющей, диафоразной и относительно высокой пероксидазной активностью. У просветляющихся промастигот снижается не только содержание РНК, но и активность диафоразы. Однако у светлых форм она опять повышается на фоне продолжающегося обеднения РНК. Наконец, метациклические формы крайне бедны РНК, диафоразы и янус-окисляющие ферменты в них очень слабы, а пероксидаза вовсе не выявляется.

Цитохимические наблюдения свидетельствуют о том, что в жизнедеятельности и дифференцировке лейшманий важную роль играет зона цитоплазмы между ядром и кинетопластом, а также вокруг последнего. Подтверждаются прежние данные об «особой окрашиваемости» этой зоны (Роскин, Романова, 1928), концентрации в ней РНК, эндоплазматического ретикулума, дыхательных ферментов (Guha e. a., 1956; Souza, Kothare, 1960; Каллиникова, Насыров, 1972; Pimenta, Souza, 1985). Важно, что базофильный цитоплазматический «тяж», соединяющий две ДНК-содержащие органеллы: ядро и кинетопласт — на определенной стадии дифференцировки промастигот (Каллиникова и др., 1987а), оказался очень богатым РНК.

Наращение вирулентности лейшманий в стационарной фазе пассажа связывают с приобретением промастиготами некоторых свойств, отличающих их от менее инвазивных форм в логарифмической фазе роста: с появлением плотного клеточного покрытия, определенных поверхностных углеводов, антигенов, рецепторов, с изменением содержания ДНК, состава белков, активности некоторых ферментов, их изоферментного профиля, с большей устойчивостью «поздних» промастигот к летальному действию человеческой сыворотки и способностью к более успешному взаимодействию с макрофагами (Doran, Herman, 1981; Franke e. a., 1985; Rizvi e. a., 1985; Alexander e. a., 1985; Sairaiva e. a., 1986; Sacks, Silva, 1987; Silva, Sacks, 1987; Darcy e. a., 1987; Howard e. a., 1987; Grögl e. a., 1987; El Amin e. a., 1987; Kweider e. a., 1987; Wozenkrait, Blackwell, 1987; Mallinson, Coombs, 1989; Pimenta e. a., 1989, 1990). И хотя промастигот с перечисленными свойствами называют метациклическими, их морфология в большинстве случаев остается неизученной.

Тем не менее показано, что метациклические формы — не только физиологический вариант промастигот, способный к инвазии позвоночного хозяина, но и определенный морфологический тип, являющийся финалом дифференцировки лейшманий в пассаже культуры и весьма сходный с метациклическими формами *Trypanosoma cruzi* (Каллиникова и др., 1987а).

В настоящей работе показано, что метациклические промастиготы имеют и определенную цитохимическую характеристику. Их особенности — крайняя бедность РНК, дисперсная форма ее выявления, очень низкая активность НАДФ-Н-диафоразы, янус-окисляющих ферментов, отсутствие пероксидазы. И если обеднение промастигот РНК в пассаже происходит постепенно, то окислительные их способности резко меняются при переходе к метациклическим формам (см. таблицу). Свойства последних свидетельствуют о том, что они сходны с метациклическими формами *T. cruzi* не только морфологически, но и цитохимически. И подобно тому как у *T. cruzi* такие особенности есть цитохимическая преадаптация к следующей стадии жизненного цикла — внутриклеточным амастиготам, бедным РНК, белком, полисахаридами, дыхательными ферментами (Каллиникова, 1987), так и цитохимия метациклических промастигот *L. major* может отражать подобную преадаптацию к аналогичной внутриклеточной амастиготной стадии в развитии лейшманий. Как и у *T. cruzi*, следующая за метациклическими промастиготами амастиготная стадия лейшманий отличается слабой диффузной реакцией РНК (Gerzeli, 1955), сниженным ее синтезом (Simpson, 1965), небольшим количеством рибосом, митохондрий, слабо развитыми аппаратом Гольджи и кинетопластом

(Rudzinska e. a., 1964; Creemers, Jadin, 1967), сниженным дыханием (Janovy, 1967), отсутствием цитохромов (Kraussner, 1966). В обнаруженных «переходных» свойствах метациклических промастигот — еще одно доказательство их назначения — осуществлять дальнейшее развитие лейшманий в позвоночном хозяине, соединяя тем самым обе части их жизненного цикла.

Связанные с морфогенезом цитохимические преобразования промастигот в каждом пассаже культуры воспроизводятся заново. Однако от пассажа к пассажи метаболические возможности культуральных форм изменяются. И падение вирулентности в процессе культивирования связано не только с постепенной утратой способности промастигот трансформироваться в метациклические формы, но и с определенными цитохимическими преобразованиями всей популяции культуральных форм и прежде всего со снижением их НАДФ-Н-диафоразной, а также пероксидазной активности. Уровень активности этих ферментов падает параллельно вирулентности, а в начале культивирования оказывается важным для длительного ее сохранения. Эта корреляция проявляется и в межштаммовых различиях. С вирулентностью особенно тесно связана диафоразная, изменяющаяся особенно существенно.

Поскольку от пассажа к пассажию доля слабоактивных по диафоразе и неактивных по пероксидазе метациклических форм в популяции уменьшается, падение активности этих ферментов в процессе культивирования лейшманий касается только прочих промастиготных форм. Значит, хотя сами ответственные за вирулентность популяции метациклические промастиготы обладают минимальной активностью диафоразы и лишены пероксидазы, для воспроизведения этих форм и сохранения вирулентности необходимо поддержание достаточно высокого уровня деятельности обоих ферментов в остальных, предшествующих морфотипах промастигот и, видимо, прежде всего светлых формах. Сильно снизившись у просветляющихся промастигот по сравнению с темными, активность диафоразы вновь повышается у светлых, что предшествует возникновению из них метациклических форм.

Видимо, в процессе культивирования происходит не столько снижение окислительной активности лейшманий, сколько перестройка их энергетического обмена. Компенсацией падения диафоразной и пероксидазной активности может быть одновременное нарастание янус-окисляющей способности этих клеток. И если активность диафоразы и пероксидазы важна для морфогенеза лейшманий в культуре и сохранения вирулентности, то янус-окислительная способность скорее связана с адаптацией паразитов к условиям культивирования, с аттенуацией.

Цитохимические исследования показывают, что использованные в работе длительно культивировавшиеся штаммы неодинаковы. Штамм Белова отличается от двух других штаммов не только более постоянным воспроизведением хотя бы единичных метациклических форм (Каллиникова и др., 1992), но и достаточно высокой диафоразной активностью на фоне крайне низкого окисления януса зеленого. Это может свидетельствовать о неодинаковых вирулентных потенциях даже аттенуированных штаммов лейшманий и еще раз подтверждает связь метациклогенеза с цитохимией промастигот.

#### Список литературы

- (Каллиникова В. Д.) Kallinikova V. D. Cytochemistry and Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 // Acta Protozool. 1987. Vol. 26, N 2. P. 153—167.  
Каллиникова В. Д., Насыров Ф. Ш. Цитохимическое изучение *Leishmania tropica* major в культуре // Цитология. 1972. Т. 14, № 2. С. 219—226.  
Каллиникова В. Д., Савина М. А., Сафьянова В. М. Дифференцировка лейшманий в культуре // Цитология. 1987а. Т. 29, № 7. С. 825—834.  
Каллиникова В. Д., Савина М. А., Сафьянова В. М. Новое о жизненном цикле лейшманий // Соврем. пробл. протозоологии. Тез. докл. IV съезда ВОПР. Л.: Наука, 1987б. С. 205.

- (Каллиникова В. Д., Насырова Р. М., Насыров Ф. Ш., Сафьянова В. М.)  
Kallinikova V. D., Nasyrova R. M., Nasyrov F. Sh., Safjanova V. M.  
Morphogenesis and Virulence of *Leishmania major* in the Process of Long-Term Cultivation // Arch. Protistenk. 1992. Bd 141. S. 327—334.
- Насырова Р. М., Насыров Ф. Ш. Морфологическая характеристика *Leishmania major* на разных стадиях развития в культуре // Соврем. пробл. протозоол. Тез. докл. IV съезда ВОПР. Л.: Наука, 1987. С. 217.
- Насырова Р. М., Каллиникова В. Д., Насыров Ф. Ш., Сафьянова В. М. Изменение морфогенеза лейшманий в процессе длительного культивирования // ДАН СССР. 1988. Т. 301, № 1. С. 213—217.
- (Роскин Гр., Романова К.) Roskin Gr., Romanova K. Die Kernteilung bei *Leishmania tropica* // Arch. Protistenk. 1928. Bd 60. S. 482—491.
- Хлгатын Д. Х. Цитохимическое изучение рибонуклеиновой кислоты в клетках некоторых представителей семейства Trypanosomatidae // Науч. докл. высш. шк. Сер. биол. науки. 1965. № 2. С. 40—42.
- Alexander J., Kilick-Kendrick R., Wilkes T. J., Bailly M. The interaction of *Leishmania major* isolated from the invertebrate host, the vertebrate host and cell free culture with mouse macrophages // Intern. Sympos. on Macrophages in Infection Immunity. Elsinore, Denmark. 17—21 May 1985.
- Brand Th. von, Johnson E. M. A comparative study of the effect of cyanide on the respiration of some Trypanosomatidae // J. Cell. a. Comp. Physiol. 1947. Vol. 29, N 1. P. 33—48.
- Часраварты Н., Санчес М., Еrcоли Н. Histochemical studies of succinic dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania leproidae* // Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. N. Y. 1962. Vol. 110, N 3. P. 517—521.
- Chang K. P. Molecular determinants of *Leishmania* virulence // VIII Intern. Congr. of Protozool. July 10—17, 1989. Tsukuba, Japan. Progr. and Abstr. P. 59.
- Chanon J. J., Blackwell J. M. A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. 1. Differences in sensitivity correlate with parasite-mediated removal of hydrogen peroxide // Parasitol. 1985. Vol. 91, N 2. P. 197—206.
- Creemers J., Jadin J. M. Etude d'ultrastructure et de la biologie de *Leishmania mexicana* Biagi, 1953. 1. Les Modifications qui surviennent lors de la transformation leishmania-leptomonas // Bull. Soc. Pathol. Exot. 1967. T. 60, N 1. P. 53—58.
- Darcy F., Torpier G., Kuznierz J. P., Rizvi T. S., Santoro F. *Leishmania chagasi*: in vitro differentiation of promastigotes monitored by flow cytometry // Exptl. Parasitol. 1987. Vol. 64. P. 376—384.
- Doran T. I., Herman R. Characterization of populations of promastigotes of *Leishmania donovani* // J. Protozool. 1981. Vol. 28. P. 345—350.
- El Amin R. M., Wright E. P., Laapman J. I., Pondman K. W. Morphological changes and serological reactions in cultured *Leishmania donovani* promastigotes // Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1987. Vol. 81. P. 918—922.
- Franke E. D., McGreevy P. B., Katz S. P., Sacks D. L. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes // J. Immunol. 1985. Vol. 134, N 4. P. 2713—2718.
- Gerzeli G. Ricerche istochimiche ed istomorfologiche sui tripanosomidi (microscopia a contrasto di fase ed interferenziale // Riv. Parasitol. 1955. Vol. 16, N 4. P. 209—215.
- Grögl M., Franke E. D., McGreevy P. B., Kuhn R. E. *Leishmania braziliensis*: protein, carbohydrate and antigen differences between log phase and stationary phase promastigotes in vitro // Exptl. Parasitol. 1987. Vol. 63. P. 352—359.
- Guha A., Pyne C. K., Sen Gupta B. B. Cytochemical studies of mitochondria in leptomonad form of *Leishmania donovani*, the kala-azar parasite // J. Histochem. a. Cytochem. 1956. Vol. 4, N 3. P. 212—216.
- Howard M. K., Sagers G., Miles M. A. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination complement resistance, and infectivity // Exptl. Parasitol. 1987. Vol. 64. P. 147—156.
- Janovy J. Jr. Respiratory changes accompanying *Leishmania* to leptomonad transformation in *Leishmania donovani* // Exptl. Parasitol. 1967. Vol. 20. P. 51—55.
- Katakura K., Kobayashi A. Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania donovani* promastigotes // Infect. a. Immunol. 1988. Vol. 56, N 1. P. 2856—2860.
- Krassner S. M. Cytochromes, lactic dehydrogenase and transformation in *Leishmania* // J. Protozool. 1966. Vol. 13, N 2. P. 286—290.
- Kweider M., Lemesre J. D., Darcy F., Kuznierz J. P., Capron A., Santoro F. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65 000-Dalton surface antigen // J. Immunol. 1987. Vol. 138. P. 299—305.
- Mallinson D. I., Coombs G. H. Interaction of *Leishmania* metacyclics with macrophages // Int. J. Parasitol. 1989. Vol. 19, N 6. P. 647—656.
- Pimenta P. F. P., Souza W. de. Fine structure and cytochemistry of the endoplasmic reticulum and its association with the plasma membrane of *Leishmania mexicana amazonensis* // J. Submicr. Cytol. 1985. Vol. 17, N 3. P. 413—419.

- Pimenta P. F. P., Silva R. P. da., Sacks D. L., Silva P. P. da. Cell surface nano-anatomy of *Leishmania major* as revealed by fractureflip. A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes // *Europ. J. Cell Biol.* 1989. Vol. 48, N 2. P. 180—190.
- Pimenta P. F. P., Sairaiva E. M. B., Sacks D. L. Comparative Ultrastructural Observations of Distinct Culture-Phase Promastigotes of Different Species of *Leishmania* // *Memoir. Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro. 1990. Vol. 85. Suppl. P. 21.
- Rizvi F. S., Afchain D., Sherlock I., Sadigursky M., Capron A., Santoro F. Infectivity of *Leishmania* promastigotes is associated with surface antigenic expression // *Immunol. Lett.* 1985. Vol. 11. P. 317—323.
- Rudzinska M. A., Alesandro Ph. A., Trager W. The fine structure of *Leishmania donovani* and the role of the kinetoplast in the leishmania-leptomonad transformation // *J. Protozool.* 1964. Vol. 1, N 2. P. 166—191.
- Sacks D. L. da., Silva R. P. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell surface expression and release of a developmentale regulated glycolipid // *J. Immunol.* 1987. Vol. 139. P. 3099—3116.
- Sairaiva E. M. B., Andrade A. F. B., Pereira M. E. A. Cell surface carbohydrate of *Leishmania mexicana amazonensis*: differences between infective and noninfective forms // *Europ. J. Cell. Biol.* 1986. Vol. 40. P. 219—225.
- Sen Gupta P. C., Bhattacharjee B., Ray H. N. The cytology of *Leishmania donovani* (Laveran a. Mesnil, 1909) Ross, 1903 // *Indian Med. Assoc.* 1953. Vol. 22, N 8. P. 305—308.
- Silva R. da., Sacks D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation // *Infect. a. Immunol.* 1987. Vol. 55, N 11. P. 2802—2806.
- Simpson L. The kinetoplast and transformation in *Leishmania* // *Progress in Protozool. Abstr. II. Intern. Congr. on Protozool. London.* 1965. P. 41—42.
- Souza E. J. de., Kothare S. N. Preliminary note on a method for the cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase in leptomonad forms of *Leishmania donovani* // *Current Sci.* 1960. Vol. 29, N 3. P. 109—110.
- Wilson M. E., Hardin K. K., Donelson J. E. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani shagasi* in virulent and attenuated promastigotes // *J. Immunol.* 1989. Vol. 143, N 2. P. 678—684.
- Wozenkraft A. O., Blackwell J. M. Increased infectivity of stationary phase promastigotes of *Leishmania donovani*: correlation with enhanced C<sub>3</sub> binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages // *Immunol.* 1987. Vol. 60. P. 559—563.

НИИ медицинской паразитологии им. Л. М. Исаева,  
Узбекистан;  
МГУ им. М. В. Ломоносова;  
Самаркандский медицинский институт им. И. П. Павлова,  
Узбекистан

Поступила 20.07.1989  
После доработки 12.02.1991

#### VIRULENCE AND SOME CYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF LEISHMANIA MAJOR DURING THE LONG-TERM CULTIVATION

R. M. Nasyrova, V. D. Kallnikova, S. Ch. Vafakulov, F. Sh. Nasyrov

**Key words:** *Leishmania*, morphogenesis, cytochemistry, virulence, cultivation

It has been shown that morphogenesis of *Leishmania major* in each culture passage is characterized by the depletion of RNA and increase in its dispersion degree, by the change of the NADP-H-diaphorase, peroxidase and Janus green-B-oxidative activity in the promastigotes.

Cytochemical peculiarities of invasive metacyclic promastigotes are an extreme depletion of RNA, its disperse form, a low activity of oxidative enzymes. This properties may manifest the pre-adaptation of *Leishmania* promastigotes to the development in vertebrate host.

In the process of long-term cultivation of *L. major* the virulence, the metacyclogenesis, and the level of NADP-H-diaphorase and peroxidase activity decrease from passage to passage, but the ability to oxidate the Janus green-B increases.