

АКАДЕМИЯ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР
Объединенный Ученый совет институтов зоологии
и экспериментальной биологии

На правах рукописи

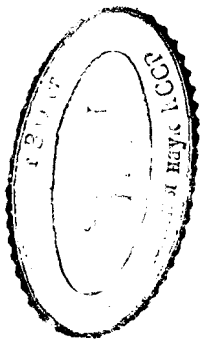
В.М. ФЕДОСЕНКО

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ТОХОПЛАЗМА GONDII

(морфология, размножение, внутриклеточное
паразитирование)

(На русском языке)

(08.106 - паразитология)



Автореферат

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических
наук

Алма-Ата - 1971

346,29
Ж 338

Работа выполнена в лаборатории токсоплазмоза Института зоологии АН Казахской ССР (директор института - доктор биологических наук Е.В.Гвоздев).

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, имеет одну схему, иллюстрирована 64 фотографиями электронномикроскопических картин. Список использованной литературы включает 67 названий работ, из которых 53 на иностранных языках.

Научный руководитель - зав.лабораторией токсоплазмоза Института зоологии АН Казахской ССР, доктор биологических наук, профессор, академик АН Казахской ССР И.Г.ГАЛУЗО.

Официальные оппоненты:

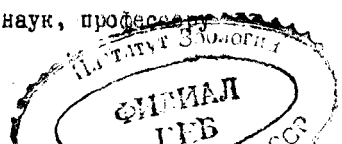
- 1. А. М. МУРЗАМАДИЕВ - доктор биологических наук, профессор.
- 2. В. Р. ЕЛАНЦЕВА - кандидат биологических наук.

Ведущее предприятие - Институт краевой патологии
Министерства здравоохранения КазССР.

Защита диссертации состоится _____ 1971 г.

Автореферат разослан _____ 1971 г.

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу г.Алма-Ата, проспект Абая, 38, Институт экспериментальной биологии АН Казахской ССР, Ученому секретарю Совета, доктору биологических наук, профессору А.М.Мурзамадиеву.



В В Е Д Е Н И Е

Токсоплазмоз в настоящее время вызывает большой интерес среди биологов, медицинских и ветеринарных работников.

Существенным звеном в изучении токсоплазмоза является исследование возбудителя заболевания *T. gondii* на субмикроскопическом уровне. Знание тонкого морфологического строения, изучение функциональных состояний возбудителя в процессе его жизнедеятельности, наблюдение за процессом паразитирования, несомненно, необходимо в решении многих спорных вопросов в таксономическом положении, размножении, жизненном цикле и паразитировании этого своеобразного простейшего организма. Работ, посвященных этой проблеме, в мировой литературе очень мало и большинство из них уже устарели в связи с повышением техники исследований биологических объектов в электронном микроскопе.

Так Bringman and Holz 1953, 1954; Holz 1954, изучали возбудитель токсоплазмоза, не прибегая к помощи ультраатома. Исследования Gustafson 1954; Ludvik 1958; Goldman 1958, разрознены и не дают полного представления о тонком морфологическом строении токсоплазмы.

Наиболее полные данные об ультраструктуре возбудителя представлены в работах Акишиной Г.Т. и Быковского А.Ф., 1964; Ogino and Yoneda 1966.

Исследования Ogino and Yoneda 1966; Sheffield and Melton 1968; Акишиной Г.Т. и Doby 1969, показали деление *T. gondii* методом эндодиогении на субмолекулярном уровне и установили

некоторые структуры, наблюдаемые в этот момент. Большинство из указанных авторов исследовали *T.gondii* на культуре ткани.

По ультраструктуре цистных форм *T.gondii* литературных данных почти нет. Несколько небольших и противоречивых работ (Garnham, Baker, Bird 1962; Kikkawa, Gueft 1964; PiekarSKI, 1969) недостаточны для представления тонкой морфологической организации цисты.

Вопрос взаимодействия паразита с клеткой хозяина на субмикроскопическом уровне в литературе почти не освещен.

Все вышесказанное явилось предпосылкой к нашей работе.

Перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Изучить ультраструктуру токсоплазм (трофозоит, циста).
2. Проследить процесс размножения пролиферативной формы.
3. Исследовать процесс взаимодействия паразита и клетки хозяина.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

I. М а т е р и а л и м е т о д и к а

Наша работа проведена на материале, полученном из Музея штаммов лаборатории токсоплазмоза Института зоологии Академии наук Казахской ССР.

Для изучения ультраструктуры и размножения пролиферативных форм токсоплазм использовался экссудат белых мышей, забитых на 4 сутки после заражения. Работу проводили с двумя штаммами "ИИ", выделенным от человека и "CDN", выделенным от собаки. Было взято по 7 инокулятов того и другого штаммов.

Электронномикроскопические исследования, связанные с цистными формами *T. gondii* мы проводили на материале из опытов И.Г.Галузо, Л.А.Высоковой и А.М.Кривковой. Материал был исследован от 16 животных, зараженных авирулентным штаммом "VFG", выделенным от чернобурой лисы. Проведено 2 серии опытов. По 2 белые мыши забивали на 20, 22, 24 день и через 2 месяца после заражения.

При проведении исследований по вопросу взаимоотношения клетки хозяина и паразита мы, в основном, использовали модель взаимоотношений *T. gondii* с моноцитом, а также паразитирование токсоплазм на культуре ткани (на материале С.И.Коноваловой - сотрудника Омского научно-исследовательского института природноочаговых инфекций).

Методика исследования ультраструктуры пролиферативных форм

Одним из основных условий успешного решения поставленных задач является выбор надежного метода фиксации. Для фиксации перитонеального эксудата белых мышей использовали два типа фиксаторов:

1. 1%-й раствор осмиевой кислоты по Шестранду.
2. 1%-й раствор осмиевой кислоты на фосфатном буфере (модифицированный нами метод приготовления фиксатора четырехокси осмия в фосфатном буфере).

Перитонеальный эксудат центрифугировался при 5000 об/мин. в течение 10 минут. Надосадочная жидкость сливалась. Осадок фиксировался в центрифужных пробирках от 45 мин. до 1 часа. в одном из указанных фиксаторов при температуре + 4°C. Споласкивание в буфере и обезвоживание в спиртах возрастающей крепости, начиная с 30% до абсолютного с периодом в 10% по 20 минут в каждом разведении, с обязательным центрифугированием при сменах.

Материал заливали смесью метакрилатов (1:4 метил метакрилат + бутил метакрилат) в желатиновые капсулы или по методике, предложенной Рейнгольдом, предполимером метакрилатов.

Методика исследования *T.gondii* на культуре ткани

Культура ткани почек эмбриона свиньи, выращенная на предметных стеклах, заражалась инокулятом штамма "GDN" и изоли-

рованными цистами штамма "VFG". Фиксация культуры тканей, зараженной штаммом "CDN", проводилась через 6, 12, 24 часа после заражения. Фиксация культуры ткани, зараженной цистами, проводилась на 1-2-4-6 сутки после заражения. Для фиксации пользовались фиксатором Колфильда. Обезвоживание в спиртах возрастающей крепости и заливка в смесь метакрилатов по методике Рейнгольда.

М е т о д и к а и с с л е д о в а н и я ц и с т н о й ф о р м ы T.gondii

Методом раздавливания небольшого кусочка головного мозга белой мыши между двумя предметными стеклами приготавливались мазки. Параллельно приготавливали суспензию из остатков того же головного мозга, из которой под контролем зрения в световом микроскопе микрокапилляром отсасывали отдельные цисты. Мазки фиксировали тремя типами фиксаторов:

1. По Колфильду.
2. По Паладе.
3. 4,5% глутаральдегидом на фосфатном буфере.

Отмытые цисты фиксировали 1% раствором осмиевой кислоты на фосфатном буфере. Обезвоживание в спиртах возрастающей крепости и заливка в эпон 812, а также в предполимер метакрилатов по методике Рейнгольда.

Тонкие срезы получали на ультрамикротоме "УЭМПТ-1" при помощи стальных ножей и наносили на сетки, предварительно

покрытые формваровой пленкой.

Срезы контрастировали в 3% растворе уранилацетата на 30% спирте и по Рейнольдсу - в цитрате свинца, которые исследовали в электронном микроскопе "УЭМВ-100" при апертурной диафрагме около 30 м.

Для фотографирования пользовались фотопластинками для ядерных исследований типа "MP" и диапозитивными, осособоконтрастными 0,5-0,7 ед. чувствительности.

Примерно было исследовано 1600 сеток со срезами и получено 815 негативных изображений электронномикроскопических картин.

П.УЛЬТРАСТРУКТУРА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ФОРМЫ *T.gondii*

Согласно электронномикроскопическим исследованиям пролиферативная форма *T.gondii* представляет собой организм удлинённой формы с заостренным передним и округлым задним концами, заключенный в двойную пелликулярную оболочку. Наружная оболочка пелликулы - непрерывная элементарная мембрана, около 90 Å толщиной. Внутренняя оболочка несколько разрыхлена и прерывиста, толщиной до 100-120 Å, расширяясь к переднему и заднему концам паразита, образует переднее и заднее отверстия. Переднее - полярное кольцо, заднее - заднее отверстие внутренней оболочки пелликулы. В пелликуле наблюдаются небольшие отверстия около 140 Å в диаметре - цитостом-

образованные наружной и внутренней оболочкой. Пелликула в средней части организма, вблизи передней трети ядра, образует микропиле. Под внутренней оболочкой пелликулы, начинаясь на полярном кольце и оканчиваясь на заднем отверстии, проходят 22 субпелликулярные фибриллы, которые служат своеобразным костяком организма. Через полярное кольцо выдвинут вперед коноид, образованный из 14-16 параллельных линий, расположенных под углом 80° к продольной оси паразита. В коноид входят протоки парных органелл, электронноплотных структур слабо конусного сечения. Проток продолжается назад и переходит в мешкоподобные образования мелкоячеистой структуры - тело парной органеллы. По количеству парных органелл *T.gondii* превосходит всех простейших, у которых они наблюдаются. В передней трети организма расположены структуры - саркомеры. По морфологическим признакам они сходны с протоками парных органелл.

Эндоплазматическая сеть *T.gondii* представлена небольшими цистернами и пузырьками, ограниченными как шероховатыми, так и гладкими мембранами. Нами прослежен переход шероховатых мембранных структур в гладкие. Эндоплазматическая сеть у токсоплазмы развита довольно слабо.

Комплекс Гольджи находится у переднего края ядра и состоит из мелких пузырьков и эллипсоидных цистерн, ограниченных гладкими мембранами.

Митохондрии округлой или овальновытянутой формы с ячеистыми кристами встречаются во всех областях цитоплазмы орга-

низма.

Цитоплазма клетки чрезвычайно богата рибосомами. Нередко в цитоплазме клетки можно встретить лизосому.

Ядро клетки занимает 1/3 объема с небольшим смещением к задней части организма. Ядро окружают два листка ядерной оболочки, между которыми различается перенуклеарное пространство. Наружний и внутренний слой ядерной оболочки образуют ядерные поры диаметром от 100 Å до 400 Å. Хроматин в форме глыбок встречается как на периферии так и в центре ядра. В ядре расположено ядрышко, у *T.gondii* обычно одно, состоящее из сферических гранул РНК размером 150 Å, плотно упакованных и связанных с нуклеолономой.

Изучив строение двух штаммов *T.gondii* "RH" и "СДж", мы не нашли какой-либо существенной разницы в их морфологической организации. На наш взгляд следует отметить, что количество элементов эндоплазматической сети у организмов штамма "ODN" больше, чем у токсоплазм штамма "RH". Наши данные по тонкому строению *T.gondii* не расходятся с данными других авторов (Г.Т.Акиншина и А.Ф.Быковский 1964, Sheffield and Melton, 1968 et al.).

Ш.РАЗМНОЖЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ФОРМЫ ТОКСОПЛАЗМ

Размножение пролиферативной формы *T.gondii* идет путем эндодиогении с образованием из одной материнской клетки двух дочерних. Наиболее ранним признаком деления является появление в цитоплазме организма у переднего края ядра двух раз-

деленных зон комплекса Гольджи и отростка Гольджи, овального тела с гомогенным содержимым, заключенным в мембранные оболочки около $0,9 \mu$ в диаметре. Затем отросток Гольджи продольно делится и расходится между двумя образующимися дочерними особями (разделение отростка Гольджи описывается нами впервые).

Ядро организма на ранней стадии деления остается без изменений за исключением ядерных участков, направленных в зоны цитоплазмы, где образуются дочерние особи. В этих участках ядра нарушается целостность ядерной оболочки и наблюдаются конические группировки из электронноплотного материала (полярные участки). Над полярными участками ядра из мембранного аппарата материнской клетки образуется внутренняя оболочка дочернего организма. Вначале образуется полярное кольцо и коноид, затем оболочка, разрастаясь, окружает в форме купола часть цитоплазмы материнской клетки над полярным участком ядра. Вместе с ростом внутренней оболочки пелликулы дочерней клетки растут и субпелликулярные фибриллы, неразрывно с ней связанные. Под образовавшимся куполом появляются "округлые" тела с гомогенным содержимым около $0,4 \mu$ в диаметре. Здесь же расположена часть разделенного отростка Гольджи. В некоторых срезах в цитоплазме материнской клетки наблюдается структура ядрышкового типа, заключенная в мембранную оболочку, приблизительно $0,4 \mu$ в диаметре, связанная извитыми мембранными протоками с дочерними клетками (сообщается впервые).

По мере дифференцирования дочерних особей они поглощают всю цитоплазму материнской клетки. К этому моменту внутренней оболочка пелликулы материнской клетки исчезает, и внутренняя оболочка дочерней особи соединяется с наружной оболочкой пелликулы материнской клетки. Отмечено наличие остаточного тела деления после расхождения дочерних особей.

Таким образом деление *T.gondii* путем эндодиогении можно условно разделить на ряд последовательных фаз:

1. Появление у переднего края ядра двух зон комплекса Гольджи и отростка Гольджи.
2. Разделение отростка Гольджи.
3. Организация из мембранного аппарата материнской клетки передних участков внутренних оболочек дочерних особей. Появление в ядре материнской клетки полярных участков.
4. Разделение ядра между дочерними особями (как идет этот процесс - вопрос остается открытым).
5. Формирование наружной оболочки дочерних особей и их расхождение. Образование остаточного тела деления.

Наши наблюдения за делением *T.gondii* подтверждают и дополняют аналогичные исследования, проведенные Ogino and Yoneda 1966; Sheffield and Melton, 1968.

1У.УЛЬТРАСТРУКТУРА ЦИСТНЫХ ФОРМ ТОКСОПЛАЗМ

Хроническое течение заболевания токсоплазмозом характеризуется накоплением в организме хозяина особой формы возбудителя - цисты. Циста представляет собой скопление множества отдельных паразитов, заключенных в оболочку.

Большой интерес представляют цисты, взятые в различные сроки после заражения белых мышей. Мы условно разделяем цисты на зрелые и незрелые, основываясь на степень дифференцирования их морфологических структур.

Оболочка, окружающая зрелую цисту, диапазон выдержки которой на белой мыши превышает 2 месяца, мембранного происхождения, образует многочисленные зубчатые выступы, направленные в ткань головного мозга.

У незрелых цист (диапазон выдержки которых на белой мыши не превышает одного месяца) мембранная оболочка не выявляется, что можно расценить либо ступешиванием ее подоболочным слоем, либо задержкой ее формирования на ранних стадиях развития цисты.

Под оболочкой цисты лежит слой плохообозначенного гранулярного вещества (подоболочный слой), который также встречается по всей сфере цисты в виде небольших острогов, плотно слитых с наружной оболочкой мерозоитов. Мелкие гранулы того же происхождения рассеяны в пространстве между мерозоитами. Подоболочный слой у зрелых цист просветлен, с меньшим количеством гранул, почти равномерно распределен под оболочкой шириной примерно 0,5 м. У незрелых цист подоболочный слой

сильно развит, плотен, но плотность его неоднородна, не одинаков по толщине в плоскости сечения цисты, толщина его варьирует от 0,5 м до 1,5 м. Незрелые цисты часто окружены большими телами, заключенными в мембранную оболочку, расположенными в ткани мозга. Эти тела по структурному строению похожи на подоболочный слой цисты.

Мерозоиты, расположенные в цисте, по своей ультраструктурной организации отличаются от трофозоитов пролиферативной формы большим количеством саркомера и гранулярного гликогена и бедностью мембранными структурами цитоплазмы. Мерозоиты зрелых цист по степени дифференцирования структур на много превосходят мерозоиты из незрелых цист. У них имеются митохондрии, ядерная оболочка, элементы эндоплазматической сети и комплекс Гольджи, тогда как у мерозоитов из зрелых цист эти структуры или вообще отсутствуют, или же слабо представлены. Пелликула таких организмов нередко теряется в гранулярных островках. Митохондрии не встречаются, мембранные структуры цитоплазмы наблюдаются в виде небольших пузырьков, ограниченных гладкой мембраной. По всей цитоплазме разбросаны мелкие гранулы, подобные гранулам подоболочного слоя. Ядро расположено в задней части паразита. Ядерная оболочка не выявляется. Ядро свободно сообщается с цитоплазмой. Пелликула мерозоитов, лежащая непосредственно в гранулярном слое, теряет свое очертание и сливается с гранулярным слоем.

При посеве цистных форм *T.gondii* на клетки культуры

ткани оболочка цисты разрушается, мерозоиты цисты встречаются как внутри клеток, так и вне их, но в структурном отношении они продолжают нести в себе признаки мерозоитов цистных форм, отличаясь от трофозоитов пролиферативной формы.

У.ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТОКСОПЛАЗМ И КЛЕТКИ ХОЗЯИНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРНОМ УРОВНЕ

Токсоплазма - внутриклеточный паразит. Нами прослежено два пути проникновения паразитирующего организма в клетку хозяина на примере моноцитарных клеток перетонеального эксудата белой мыши.

Первый путь проникновения связан с фагоцитирующей способностью лейкоцитарных клеток. Второй путь - агрессивное внедрение паразита в клетку хозяина. Паразит с помощью секрета парных органелл лизирует цитоплазматическую оболочку клетки хозяина в месте проникновения. Цитоплазма клетки хозяина реагирует на внедрение паразита образованием больших нетипичных для клетки вакуолей. В вакуолях цитоплазмы клетки хозяина, непосредственно контактирующей с паразитом, отмечается наличие трубчатых структур с диаметром 200 Å. Внутриклеточно *T.gondii*, как правило, расположена в вакуоле, ограниченной единичной мембраной от цитоплазмы клетки хозяина. Эта мембрана образует значительное количество тонких выросто-ворсинок, приблизительно 200 Å в диаметре, направленных внутрь вакуоли. Ворсинки извитой конфигурации в зависимости от плоскости среза имеют вид

коротких трубочек или окружностей. Вокруг вакуолярной мембраны со стороны цитоплазмы клетки хозяина расположены вытянутые цистерны эндоплазматической сети, причем стороны цистерн, обращенные к вакуоли с паразитом, всегда построены из гладких мембран, противоположные же - из шероховатых. То есть в цистернах эндоплазматической сети, окружающих вакуоль с паразитом, всегда наблюдается переход шероховатых мембранных структур в гладкие.

Вакуоль с паразитом можно встретить в любом участке цитоплазмы, но чаще мы наблюдали ее вблизи ядра, и нередко ядро контактирует с мембраной вакуоли. Митохондрии клетки хозяина концентрируются вблизи вакуоли с паразитом. Иногда расстояние между мембраной вакуоли и мембраной митохондрии невозможно различить. Эти скопления митохондрий указывают на значительные энергетические процессы, протекающие в зоне паразитирования токсоплазмы. Однако, *T. gondii* встречается в клетке хозяина непосредственно в цитоплазме, без наличия вакуоли. Морфологическая картина взаимоотношения паразита и клетки хозяина в этих случаях совсем иная. Пелликулярная оболочка паразита ступенчатая, митохондрии набухшие, их матрикс просветлен, кристы сглажены, хотя и сохраняют ячеистое строение. В одних случаях ядерный материал диффузно распределен в цитоплазме с сохранившимися глыбками хроматина, ядерная оболочка не видна; в других - ядерная оболочка в стадии дегенерации, хроматин в центре ядра имеет причудливую конфигурацию. В цитоплазме таких токсоплазм по-

являются гранулы гликогена, схожие с таковыми у мерозоитов цистных форм. Митохондрии клетки хозяина набухшие, матрикс просветлен, кристы лизированные.

При паразитировании *T.gondii* в цитоплазме моноцита появляются новые структуры, условно нами разделенные на три типа:

1. Липидные гранулы.
2. Структуры мембранного типа.
3. Включения, ограниченные единичной мембраной, заполненные гранулами неопределенного вида.

Считаем, что вышеуказанные структуры сопутствуют паразитированию токсоплазм, что подтверждаем микрофотографиями.

Подводя итог нашей работы, мы приводим краткое обсуждение, где полученные нами материалы исследований связываем и анализируем с литературными данными электронномикроскопических исследований простейших, относящихся к классу *Sporozoa*.

ВЫВОДЫ

1. У трофозоитов *T.gondii* с помощью электронномикроскопических исследований выявлены пелликулярная оболочка, состоящая из двух мембранных слоев: наружного и внутреннего, а также цитостом, полярное кольцо, заднее отверстие, микропилле, коноид, парные органеллы, саркомемы, субпелликулярные фибриллы, эндоплазматическая сеть, сходные с соответствующими органеллами спорозоитов кокцидий и малярийных паразитов.

2. Процесс деления трофозоитов *T. gondii* идет только путем эндодиогении с образованием из одной материнской клетки двух дочерних. Первым признаком начала деления является появление в цитоплазме организма отростка Гольджи с последующим его разделением на двое и расхождением между образовавшимися дочерними особями.

В образовании розетки наблюдаются те же стадии эндодиогении за исключением финального конца деления, когда у сформированных дочерних особей не разделились задние концы, а дочерние клетки вновь начинают делиться. Процесс образования розетки идет в одной плоскости, синхронно.

3. Накопление отдельных организмов (мерозоитов) в цисте на ранней стадии развития происходит, очевидно, за счет их образования в плохообозначенном гранулярном слое цисты.

Различная степень дифференцирования морфологических структур у мерозоитов цистных форм, взятых в разные периоды времени паразитирования, предполагает наличие стадий в формировании и созревании цисты.

Предполагаем, что циста *T. gondii* выполняет функцию инзонта в эндогенном цикле развития паразита.

4. Проникновение паразита в клетку хозяина происходит двумя путями:

а) паразит попадает в клетку хозяина за счет фагоцитарной функции самой клетки;

б) за счет агрессивного внедрения паразита с расплавлением наружной цитоплазматической мембраны клетки в месте проникновения при помощи энзимов парных органелл.

Мембрана, ограничивающая вакуоль с паразитом, и цистерны эндоплазматической сети, окружающие ее, играют исключительную роль в метаболизме между паразитом и клеткой хозяина.

Скопление митохондрий в зоне паразитирования указывает на значительные энергетические затраты, требуемые для проходящих здесь процессов.

Неспецифичные включения в цитоплазме клетки хозяина (моноцита) при паразитировании *T.gondii* можно рассматривать как реакцию клетки хозяина на внедрившегося паразита.

Разрушение клеток организма происходит в результате прогрессивного накопления пролиферативных форм паразита, что приводит к их истощению и разрушению.

5. Наличие у *T.gondii* морфологических структур (коноид, парные органеллы, микропиле, цитостом и др.), сходные с таковыми у кокцидий и малярийных паразитов, и выявленный в последнее время половой цикл размножения *T.gondii* с образованием спор, является убедительным доказательством, что *T.gondii* относится к классу Sporozoa.

По материалам диссертации автором
опубликованы следующие работы:

1. Изучение паразитирования *Toxoplasma gondii* в лейкоцитарных клетках методом электронной микроскопии. Сборник "Успехи протозоологии" Л. Наука, 1969.

2. К изучению паразитирования *Toxoplasma gondii* в лейкоцитарных клетках методом электронной микроскопии. Сборник "Материалы научной конференции молодых биологов г. Алма-Аты", Алма-Ата, 1970.

3. Паразитирование *Toxoplasma gondii* в моноцитах. Сборник "Материалы второй научной конференции молодых ученых АН Каз.ССР", Алма-Ата, 1970.

4. Ультраструктура трофозоитов и цистных форм *T. gondii*. Книга "Диагностика токсоплазмоза животных", Наука, Алма-Ата, 1971.

УГ1597. Отпечатано на ротапринте КазНИИИТИ.
Заказ 1597-200.