

УДК 576.893.161.13

**НЕОБЫЧНЫЙ СПОСОБ ФОРМИРОВАНИЯ  
ИНВАЗИОННЫХ СТАДИЙ У LEPTOMONAS RIGIDUS  
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)**

© А. О. Фролов, С. А. Подлипаев

Жгутиконосцы *Leptomonas rigidus* (Podlipaev e. a., 1991) формируют инвазионные стадии в ранней части средней кишки клопов *Salda littoralis* (Hemiptera: Saldidae). Отдельные промастиготы прикрепляются к кишечному эпителию своими расширенными жгутиками. В процессе деления жгутиконосцев субмембранные микротрубочки сближаются, цитоплазма конденсируется и формируются зоны плотно упакованных рибосом. Ядерный хроматин образует лабиринтоподобные структуры. ДНК-содержащая часть кинетопласта конденсируется. Жгутиковый карман укорачивается, и его полость наполняется гомогенным матриксом средней электронной плотности. Жгутики укорачиваются, и образовавшиеся амастиготы выходят в просвет кишечника. Обсуждаются взаимоотношения между различными типами формирования инвазионных стадий у трипанозоматид.

Большинство трипанозоматид, паразитирующих в пищеварительной системе насекомых, имеют инвазионные стадии, способные заражать новых хозяев после существования в течение некоторого времени во внешней среде. Известны три основные формы таких стадий: свободноживущие мастиготы, эндомастиготы и цистоподобные амастиготы.

Свободноживущие жгутиковые инвазионные стадии типичны для тех трипанозоматид, у которых они попадают в жидкую среду, например в разлагающуюся органику или воду (Clark e. a., 1964; Малышева, Фролов, 1993; McGhee, Cosgrove, 1980; Tieszen e. a., 1989a). Строение этих стадий мало отличается от морфологии жгутиконосцев, населяющих кишечник насекомого. Обычно такие стадии могут выживать во внешней среде от нескольких часов до 3–4 дней. Однако у *Crithidia fasciculata* они могут выживать в воде в течение 7–8 дней и могут делиться в течение первых 3 дней (Малышева, Фролов, 1993). Такие инвазионные стадии известны в родах *Leptomonas*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* и *Crithidia*.

Основная особенность эндомастигот – расположение всего жгутика внутри жгутикового кармана (Фролов, 1994; Janovy e. a., 1974). Инвазионные эндомастиготы – это стадии, приспособленные к выживанию в условиях дефицита влаги. Эндомастиготы могут выживать во внешней среде в течение 7–10 дней, а иногда и дольше. Они играют роль инвазионных стадий у *Proteomonas* и, возможно, у некоторых *Herpetomonas* и *Leptomonas* spp. (Фролов, Малышева, 1992; Janovy e. a., 1974). Цистоподобные амастиготы были описаны у представителей родов *Leptomonas* и *Blastocrithidia*. Известно два пути формирования таких стадий, причем оба включают образование розетковидных ассоциатов клеток, в которых простейшие соединяются друг с другом своими жгутиками (Фролов, Скарлато, 1990; Фролов и др., 1991). В первом случае образуются симметричные розетки, что является результатом нескольких равных продольных делений материнской клетки без отделения дочерних клеток (Фролов и др., 1991). Соединение между жгутиконосцами в таких розетках осуществляется укороченными жгутиками. Во время

формирования цистоподобных амастигот трипанозоматиды проходят три стадии: мастигот, эндомастигот и амастигот. Последняя стадия является инвазионной формой в роде *Leptomonas*. Строение этих стадий и особенно организация их поверхностных структур варьируют у различных видов *Leptomonas* (Фролов, Скарлато, 1990; Фролов и др., 1991; Molyneux, Croft, 1980). Однако ни у кого из исследованных жгутиконосцев этой группы ядерный хроматин не образует лабиринтоподобных структур.

Второй путь формирования цистоподобных стадий описан у представителей родов *Leptomonas* и *Blastocrithidia* (Lauge, Nishioka, 1977; Mehlhorn e. a., 1979; Tieszen e. a., 1985; Tieszen e. a., 1989b). В этом случае также формируются розетковидные ассоциаты жгутиконосцев, однако формирующиеся розетки являются асимметричными. Деление материнской особи протекает по типу почкования и приводит к образованию „straphangers” или „жгутиковых цист” (Lauge, Nishioka, 1977; McGhee, Hanson, 1962; Wallace, 1966). Мелкие дочерние клетки прикрепляются к жгутику материнской особи укороченными жгутиками и могут делиться еще несколько раз. В процессе деления стадии мастигот, эндомастигот и амастигот следуют друг за другом. Последние покидают ассоциат. Особенностью „straphangers” является то, что субмембранные микротрубочки погружаются в электронно-плотный слой субмембранной цитоплазмы, а ядерный хроматин трансформируется в лабиринтоподобные структуры (Lauge, Nishioka, 1977).

Настоящая работа посвящена результатам электронно-микроскопического исследования необычного способа формирования инвазионных стадий у жгутиконосца *Leptomonas rigidus* (Podlipaev e. a., 1991).

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клопы *Salda littoralis* L. были собраны на супралиторали Белого моря (Кандалакшский залив, губа Чупа, мыс Картеш) под толстым слоем выбросов фукоидов (Podlipaev e. a., 1991). Кишечники зараженных клопов были помещены в среду для культивирования *Leptomonas rigidus* (Podlipaev e. a., 1991). Кишечник фиксировался холодным 2.5 %-ным глутаральдегидом на 0.1 М какодилатном буфере (pH = 7.2) в течение 24 ч; после промывки в том же буфере, содержащем 5 % сахарозы, была проведена постфиксация 2 %-ным OsO<sub>4</sub> на 0.1 М какодилатном буфере (pH = 7.2), 2 ч. После обезвоживания материал заливался в смесь эпона и аралдита. Срезы контрастировались уранил ацетатом (1 ч) и цитратом свинца (5 мин). Материал изучался под электронным микроскопом JEM-100 C.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

В кишечнике *Salda littoralis* промастиготы *Leptomonas rigidus* локализуются в просвете кишечника или прикреплены к кишечному эпителию. Строение жгутиконосцев из кишечника *S. littoralis* сходно со строением культуральных форм, описанных ранее (Podlipaev e. a., 1991). Расстояние между субмембранными микротрубочками неодинаково и варьирует от 20 до 200 нм (рис. 1, 1; см. вкл.). В промежутках между микротрубочками часто располагаются ветви митохондрии (рис. 1, 2). Сходная организация поверхностных структур ранее была описана только у трипанозоматид, содержащих симбионтов (Freymuller, Camargo, 1981). Однако в отличие от симбионтсодержащих трипанозоматид в жгутиках *L. rigidus* имеется развитый параксиальный тяж.

В клетках *L. rigidus* из кишечника клопов митохондрии не образуют пренуклеарные и постнуклеарные фрагменты, как это было описано для культуральных форм этого вида (Podlipaev e. a., 1991), а также для отдельных стадий другого культивируемого вида из рода *Leptomonas* – *L. mucophilus* (Фролов, Скарлато, 1990). В ядрах промастигот *L. rigidus* часто встречаются глобулы средней электронной плотности диаметром 40–45 нм (рис. 1, 2; см. вкл.). В целом морфология промастигот *L. rigidus* сходна с таковой большинства других трипанозоматид (Vicker-man, Preston, 1976).

Промастиготы начинают дифференцироваться в инвазионные стадии в превентрикулярной части средней кишки клопов. Их жгутики укорачиваются и расширяются, формируя типичную для трипанозоматид прикрепительную органеллу (рис. 2, 1–3). Жгутиковый карман укорачивается и гомогенный матрикс средней электронной плотности наполняет его полость (рис. 2, 3). На этой стадии ядерный хроматин трансформируется в лабиринтоподобные структуры (рис. 2, 1, 2, 4; 3, 1, 2; см. вкл.). Жгутиконосцы продолжают делиться, но клеточные ассоциаты не формируются, а дочерние особи занимают свободное пространство на поверхности кишечного эпителия. ДНК-содержащая часть кинетопласта конденсируется (рис. 2, 3, 4). После редукции жгутика амастиготы выходят в просвет кишечника и мигрируют в его заднюю часть (рис. 3, 2, 3). В процессе формирования амастигот имеет место конденсация цитоплазмы и формирование обширных зон плотно упакованных рибосом (рис. 3, 2–4). Субмембранные микротрубочки образуют правильный ряд с расстоянием между соседними микротрубочками около 20 нм (рис. 3, 3). У амастигот *L. rigidus* отсутствует гликокаликс и не формируется слой плотной цитоплазмы под плазматической мембраной (рис. 3, 4).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Интересно сравнить морфологию инвазионных стадий и пути их формирования у различных трипанозоматид. У *L. rigidus*, так же, как у некоторых других видов *Leptomonas* и *Blastocrithidia*, амастиготы играют роль инвазионных стадий. Как было упомянуто выше, у *Leptomonas* и *Blastocrithidia*, изученных ранее, цистоподобные амастиготы формируются двумя независимыми путями, но всегда с формированием розетковидных клеточных ассоциатов (рис. 4, 1, 4). У *Leptomonas rigidus* промастиготы превращаются в амастиготы без формирования клеточных ассоциатов жгутиконосцев. Однако процесс клеточной дифференцировки сопровождается прикреплением отдельных жгутиконосцев к кишечному эпителию хозяина (рис. 4, б). Таким образом, наши данные свидетельствуют о необходимости контакта жгутика тех клеток, которые формируют инвазионные стадии, с каким-нибудь субстратом: или со жгутиком других клеток, или с кишечным эпителием хозяина. Хотя способ формирования амастигот *Leptomonas rigidus* достаточно оригинален, наличие лабиринтоподобных структур связывает этот вид с теми трипанозоматидами, которые образуют „жгутиковые цисты” (straphanger): *L. oncopelti*, *L. lygaei*, *B. familiaris*, *B. triatoma* (Lauge, Nishioka, 1977; Mehlhorn e. a., 1979; Tieszen e. a., 1985; Tieszen e. a., 1989b). У этих видов амастиготы имеют слой специализированной субмембранной цитоплазмы, что отличает их от *L. rigidus*. Напротив, отсутствие такого слоя цитоплазмы под плазмалеммой сближает амастигот *L. rigidus* с *Leptomonas* sp. из блох (Molynoux, Croft, 1980). По морфологии амастигот *L. rigidus* далек от *L. jaculum*, цистоподобные стадии которого формируются в симметричных розетках, имеют слой специализированной субмембранной цитоплазмы и не имеют лабиринтоподобных структур в ядрах (рис. 4, 1). Таким образом, в роде *Leptomonas* наблюдается большое разнообразие путей

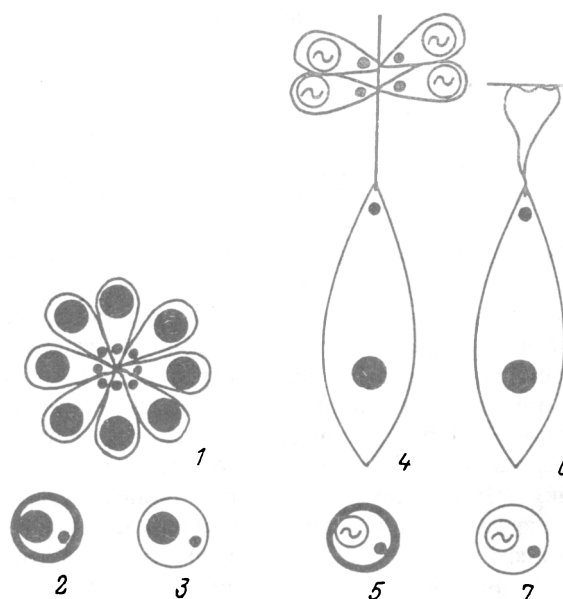


Рис. 4. Схема формирования цистоподобных тел у низших трипанозоматид.

1 — формирование цистоподобных стадий в симметричных розетках; 2 — цистоподобные стадии *Leptomonas jaculum* с плотным слоем субпелликулярной цитоплазмы и без лабиринтоподобных структур ядерного хроматина; 3 — цистоподобные стадии *Leptomonas* sp. из блох без плотного слоя и лабиринтоподобных структур ядерного хроматина; 4 — формирование цистоподобных стадий в асимметричных розетках; 5 — цистоподобные стадии (*Leptomonas lygaei*, *L. oncopelti*, *Blastocrithidia familiaris*, *B. triatomae*) с плотным слоем цитоплазмы и лабиринтоподобными структурами ядерного хроматина; 6 — формирование цистоподобных стадий без образования клеточных ассоциатов; 7 — цистоподобные стадии *L. rigidus* без плотного слоя цитоплазмы, но с лабиринтоподобными структурами ядерного хроматина.

Fig. 4. The scheme of formation modes of cyst-like bodies in the lower trypanosomatides.

формирования и строения цистоподобных инвазионных стадий; кроме того, многие лептомонасы отличаются друг от друга по этим признакам значительно больше, чем, например, *L. oncopelti* от представителей рода *Blastocrithidia*. Такая изменчивость позволяет предположить: или то, что в пределах рода *Leptomonas* происходит становление различных способов формирования инвазионных амастигот; или что род *Leptomonas* является гетерогенным и объединяет весьма разнородные организмы. Ответ на этот вопрос должны дать будущие исследования.

Данное исследование было выполнено при частичной поддержке Международного научного фонда (International Science Foundation, R6R000), Международного научного фонда и Российского правительства (грант R6R300) и Российского фонда фундаментальных исследований.

#### Список литературы

- Малышева М. Н., Фролов А. О. Свободноживущие инвазионные стадии трипанозоматид из водных насекомых // Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 4. С. 337–340.  
 Фролов Ф. О., Малышева М. Н. Эндамастиготы — особый тип расселительных стадий трипанозоматид рода *Proteomonas* // Паразитология. 1992. Т. 26, вып. 4. С. 351–354.  
 Фролов А. О., Скарлато С. О. Дифференциация *in vitro* цистоподобных клеток *Leptomonas muscophilus* // Цитология. 1990. Т. 32, № 10. С. 985–992.

- Фролов А. О., Скарлато С. О., Шаглина Е. Г. Морфология цистоподобных клеток жгутиконосцев *Leptomonas jасulum* // Цитология. 1991. Т. 33, № 10. С. 960–969.
- Фролов А. О. Классификация морфологических форм жгутиконосцев сем. Trypanosomatidae // Паразитология. 1994. Т. 28, вып. 3. С. 261–269.
- Clark T. B., Kellen W. R., Lindegren J. E., Smith T. A. The transmission of *Crithidia fasciculata* Leger, 1902 in *Culiseta incidens* (Thomson) // J. Protozool. 1964. Vol. 11. P. 400–402.
- Freymuller E., Camargo E. P. Ultrastructural differences between species of trypanosomatid with and without endosymbionts // J. Protozool. 1981. Vol. 21. P. 175–182.
- Janovy J., Lee K., Brumbaugh J. The differentiation of *Herpetomonas megaseliae*: ultrastructural observations // J. Protozool. 1974. Vol. 21. P. 53–59.
- Lauge G., Nishioka R. S. Ultrastructural study of the relations between *Leptomonas oncopelti* (Noguchi and Tilden), Protozoa Trypanosomatidae, and rectal wall of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Hemiptera: Lygaeidae) // J. Morphology. 1977. Vol. 154. P. 291–306.
- McGhee R. B., Cosgrove W. B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae // Microbiol. Rev. 1980. Vol. 44. P. 140–173.
- McGhee R. B., Hanson W. L. Growth and reproduction of *Leptomonas oncopelti* in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* // J. Protozool. 1962. Vol. 9. P. 488–493.
- Mehlhorn H., Schaub G. A., Peters W., Haberkorn A. Electron microscopic studies on *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al., 1971 (Trypanosomatidae) // Tropenmed. Parasitol. 1979. Bd 30. S. 289–300.
- Molyneux D. H., Croft S. L. Studies on the ultrastructure of candidate „cysts” in *Leptomonas* species of Siphonaptera // Z. Parasitenkd. 1980. Bd 63. S. 233–239.
- Podlipaev S. A., Malysheva M. N., Kolesnikov A. A. *Leptomonas rigidus* sp. n. (Trypanosomatidae) – a parasite of *Salda littoralis* L. (Hemiptera: Heteroptera) // Acta Protozoologica. 1991. Vol. 30. P. 121–127.
- Tieszen K., Molyneux D. H., Abdel-Hafez S. K. Ultrastructure of cyst formation in *Blastocrithidia familiaris* in *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae) // Z. Parasitenkd. 1985. Bd 71. S. 179–188.
- Tieszen K., Kenneth L., Molyneux D. H. Transmission and ecology of trypanosomatid flagellates of water striders (Hemiptera, Gerridae) // J. Protozool. 1989a. Vol. 36. P. 395–400.
- Tieszen K., Molyneux D. H., Abdel-Hafez S. K. Hostparasite relationships and cysts of *Leptomonas lygaei* (Trypanosomatidae) in *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae) // Parasitology. 1989b. Vol. 98. P. 395–400.
- Vickerman K., Preston T. M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates // Biology of the Kinetoplastida / Ed. Lumsden W. H. R., Evans D. A. Vol. 1. London; N. Y.; San-Francisco: Academic Press. 1976. P. 35–130.
- Wallace F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids // Exp. Parasitol. 1966. Vol. 18. P. 124–193.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034

Поступила 2.11.1995

#### THE UNUSUAL MODE OF FORMATION OF THE TRANSMISSION STAGES IN *LEPTOMONAS RIGIDUS* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)

A. O. Frolov, S. A. Podlipaev

*Key words:* *Leptomonas rigidus*, promastigote, amastigote, transmission stages, transformation.

#### SUMMARY

The flagellate *Leptomonas rigidus* (Podlipaev e. a., 1991) forms transmission stages in the posterior part of midgut of the bug *Salda littoralis* (Hemiptera: Saldidae). Solitary promastigotes attach to the surface of the gut epithelium with their widened flagella. In the course of divisions of the flagellates the subpellicular microtubules come closer to each other, the cytoplasm condenses and a zone of densely packed ribosomes is formed. Nuclear chromatin transforms into a labyrinth-like structure and the DNA-containing part of the kinetoplast also condenses. The flagellar pocket considerably shortens and its cavity becomes filled with a homogeneous matrix of medium electron density. The flagellum is being reduced, amastigotes are released into the gut lumen. The relation between various types of the formation of transmission stages in the trypanosomatids is discussed.

Вклейка к ст. А. О. Фролова и С. В. Подлипаева

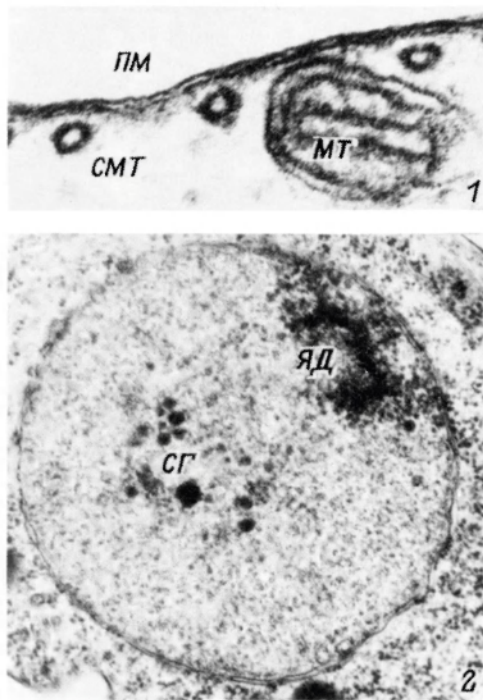


Рис. 1. Тонкое строение промастигот *Leptomonas rigidus*.

1 — поперечный срез,  $\times 180\ 000$ ; 2 — ядро промастиготы,  $\times 86\ 000$ ; МТ — ветви митохондрия; ПМ — плазматическая мембрана; СГ — сферические глобулы; СМТ — микротрубочки; ЯД — ядрышко.

Fig. 1. The fine structure of promastigote of *Leptomonas rigidus*.

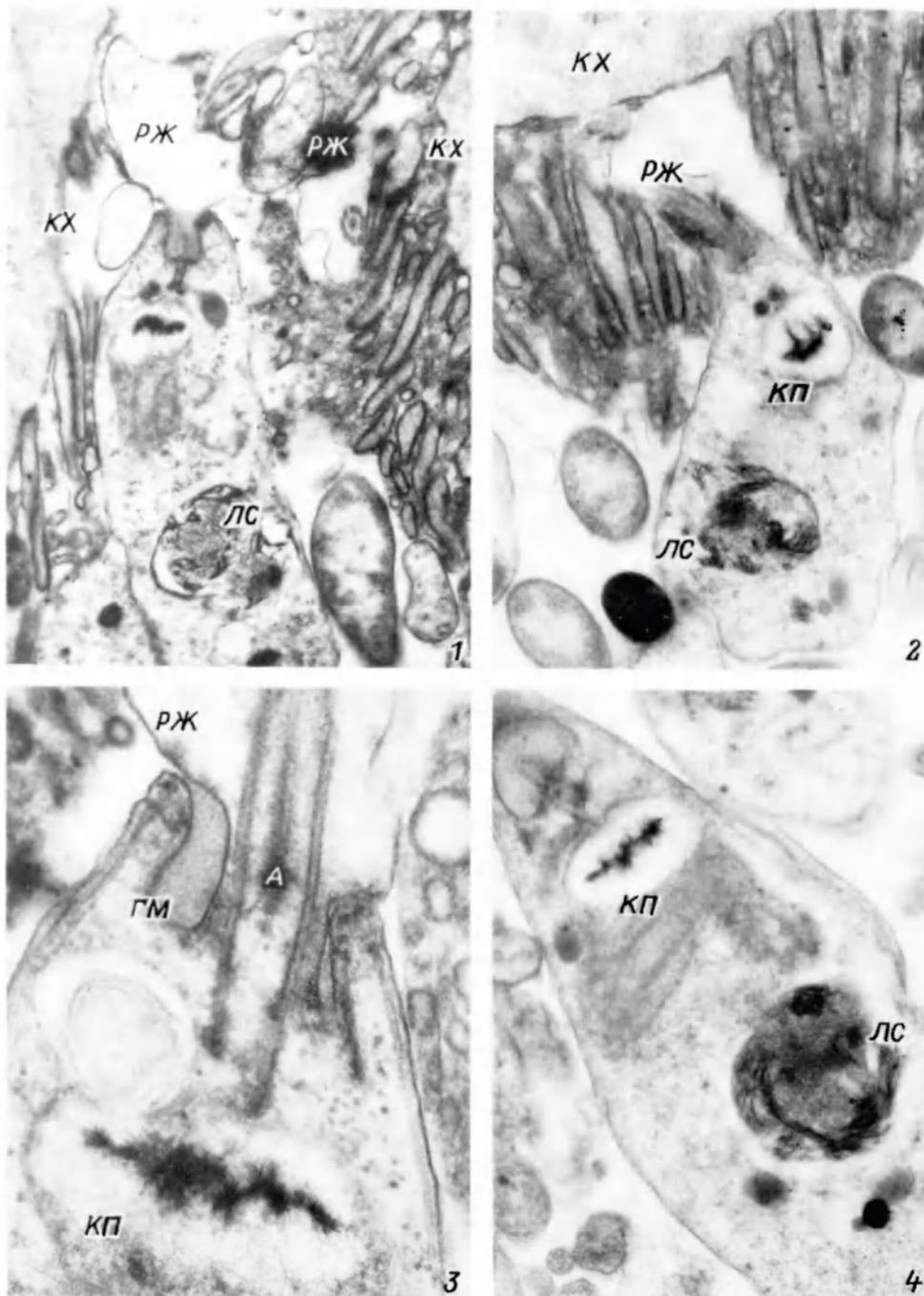


Рис. 2. Трансформация промастигот *Leptomonas rigidus* в амастиготы.

1, 2 — прикрепление жгутиконосцев с помощью расширенного жгутика,  $\times 18\ 000$ ,  $\times 20\ 000$ ; 3 — передний конец промастиготы,  $\times 60\ 000$ ; 4 — строение ядра и кинетопласта,  $\times 30\ 000$ ; А — аксонема; ГМ — однородный матрикс; КП — кинетопласт; КХ — клетка средней кишки хозяина; ЛС — лабиринтоподобные структуры; РЖ — расширенный жгутик.

Fig. 2. Transformation of promastigotes of *Leptomonas rigidus* into amastigotes.

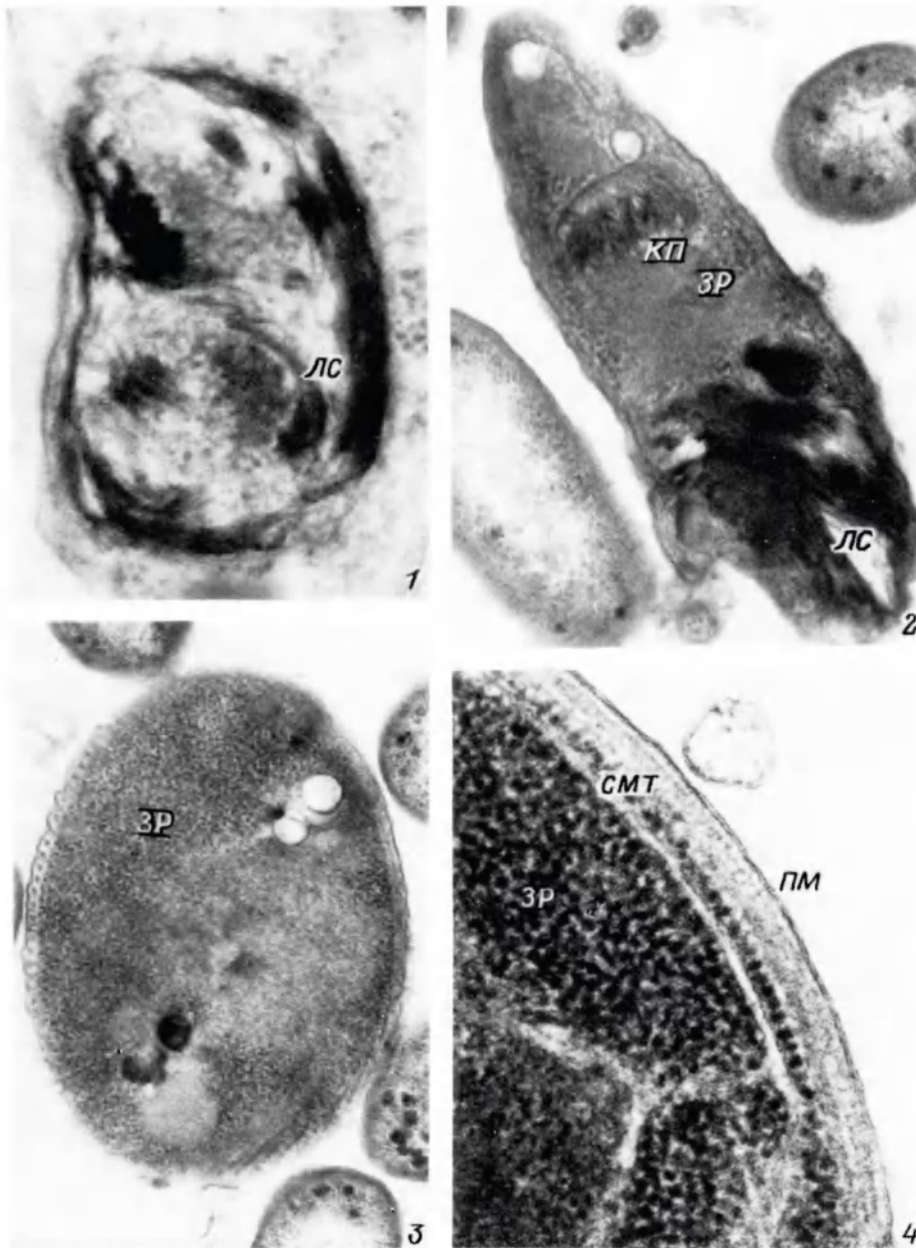


Рис. 3. Формирование амастигот *Leptomonas rigidus*.

1-3 — общий вид формирующихся амастигот, 1 —  $\times 75\ 000$ , 2 —  $\times 44\ 000$ , 3 —  $\times 36\ 000$ ; 4 — покровные структуры сформированной амастиготы,  $\times 100\ 000$ ; ЗР — зоны плотно упакованных рибосом.  
Остальные обозначения такие же, как на рис. 1 и 2.

Fig. 3. The amastigote formation in *Leptomonas rigidus* from rectum of *Salda littoralis*.