

ОБРАЗОВАНИЕ ЦИСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЖГУТИКОНОСЦЕВ *LEPTOMONAS ONCOPELTI* В СРЕДНЕЙ КИШКЕ КЛОПА *ONCOPELTUS FASCIATUS*

© М. Н. Малышева,¹ А. О. Фролов,^{1,*} С. О. Скарлато²

¹ Зоологический институт РАН и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: frolal@online.ru

Методами световой и электронной микроскопии изучено образование цистоподобных клеток *Leptomonas oncopelti* (Трипаносоматиде) в средней кишке клопа *Oncopeltus fasciatus* (Lygaeidae). Формирование «цист» начинается с неравного деления промастиготы в просвете кишечника насекомого-хозяина. Клеточная перетяжка начинает образовываться на латеральной поверхности передней половины материнской клетки и наращивается к ее апикальному концу. После завершения цитокинеза передний конец меньшей дочерней клетки (клетки С1) остается соединенным со жгутиком материнской промастиготы. Далее клетка С1 делится дважды, образуя сначала две равные по размеру клетки С2, а затем розетку из четырех мелких морфологически сходных клеток С3. Клетки С2 соединены друг с другом, а клетки С3 между собой с помощью коротких цитоплазматических выростов, образующихся вместо жгутиков. При этом в участке прикрепления цитоплазматического выроста одной из клеток С2, а затем только одной из клеток С3 к жгутику материнской промастиготы формируется зональная десмосома. По своему строению и особенностям дифференцировки клетки С1—С3 *L. oncopelti* аналогичны так называемым жгутиковым цистам некоторых других представителей родов *Leptomonas* и *Blastocrithidia*. Кинетосомы обнаруживаются у клеток С1 и С2, однако не найдены у клеток С3. Нити ДНК кинетопласта клеток С3 теряют петлевидную упаковку и слипаются в плотную неструктурированную массу. Хроматин клеток С3 конденсируется и образует характерную «лабиринтовидную структуру», которая представляет собой пучок извитых фибрилл толщиной 3—5 нм. Внутри пучка хроматиновых фибрилл имеются каналы диаметром 10—12 нм, заполненные кариеоплазмой. В конце концов клетки С3 округляются, отделяются от жгутика материнской промастиготы, а также друг от друга и трансформируются в зрелые «цисты». Наружной защитной оболочки (стенки цисты) у «жгутиковых цист» С1—С3 и зрелых «цист» *L. oncopelti* нет. Однако функции стенки «цисты» паразита выполняет сложный кортикальный комплекс, состоящий из утолщенной плазматической мембраны и подлежащего слоя плотной мелкозернистой цитоплазмы, в котором не регистрируются субпелликулярные микротрубочки. Эндоплазма зрелых «цист» характеризуется высокой электронной плотностью, вследствие чего большинство клеточных органелл не идентифицируются. Тем не менее в клетках С3 и зрелых «цистах» *L. oncopelti* выявляются необычные мембраны, состоящие из двух менее контрастных наружных слоев и одного более контрастного внутреннего слоя.

Ключевые слова: жгутиконосцы, трипаносоматиды, цистоподобные клетки.

Принятые сокращения: клетки С1, С2 и С3 — клетки лептомонад 1, 2 и 3-го поколений, образующиеся при формировании «жгутиковых цист».

Гомоксенные жгутиконосцы-трипаносоматиды — ближайшие родственники лейшманий и трипаносом, среди которых известно немало видов, патогенных для человека и животных (Догель, 1947; Wallace, 1966; Мольнеух, Ashford, 1983). Жизненные циклы гомоксенных трипаносоматид включают в себя эндогенную фазу, реализующуюся в организме беспозвоночного хозяина, и экзогенную фазу, протекающую во внешней среде. Переход к экзогенной фазе жизненного цикла сопряжен с формированием мелких компактных клеток, которые обеспечивают расселение жгутиконосцев и переживание ими неблагоприятных условий. У многих видов гомоксенных трипаносоматид, паразитирующих в насекомых, мелкие компактные клетки лишены жгутика (обычно эти клетки называют амастиготами) и внешне напоминают цисты других протистов. Однако эти амастиготы

не могут считаться настоящими цистами (Догель, 1947), поскольку у них не образуется внешняя защитная оболочка — стенка цисты (Wallace, 1966). Такие мелкие амастиготы гомоксенных трипаносоматид в современной литературе обычно называют цистоподобными клетками или пишут о них как о цистах, беря это слово в кавычки.

Светооптически «цисты» описаны у представителей только двух родов трипаносоматид — *Leptomonas* и *Blastocrithidia*, причем различают по крайней мере четыре способа формирования этих компактных клеток. Первый способ, который обнаружен у всех хорошо изученных бластокритидий и немногих лептомонад, связан с неравным делением родительской клетки. При этом будущие «цисты» образуются из потомков меньшей дочерней клетки, которая затем претерпевает еще несколько

равных бинарных делений. В результате формируются маленькие овальные клетки, так называемые жгутиковые цисты (*straphangers*), которые долгое время сохраняют связь со жгутиком родительской клетки. После отделения от жгутика клетки «жгутиковые цисты» становятся зрелыми «цистами», выводятся из организма хозяина во внешнюю среду, где они служат источником заражения нового хозяина (Patton, 1908; Gibbs, 1950; McGhee, Hanson, 1962; Laugé, Nishioka, 1977; Schaub, Pretsch, 1981; Подлипаев, Фролов, 1987; Фролов, 1987; Schaub et al., 1990; Скарлато, 2003).

Второй способ формирования цистоподобных клеток отмечен только у некоторых видов лептомонад, причем в этом случае начальные этапы формирования «цист» связаны с сериями равных бинарных делений жгутиконосцев в составе розетковидных клеточных ассоциатов. Эти деления не сопровождаются ростом дочерних клеток (Loučková, 1974; Abe, 1980; Molyneux, Croft, 1980; Фролов, Скарлато, 1990а, 1990б, 1991; Фролов и др., 1991).

Третий способ формирования цистоподобных клеток обнаружен у жгутиконосцев из рода *Blastocrithidia*, которые обитают в кишечнике водомерки *Gerris lacustris* (Фролов и др., 1997). Формирование «цист» у этого жгутиконосца начинается с образования на теле материнского организма своеобразной «почки», содержащей 4 ядра и 4 кинетопласта. После обособления от материнской клетки «почка» сразу распадается на 4 отдельные «цисты».

Наконец, четвертый способ формирования «цист», который отмечен у промастигот *Leptomonas rigidus* из клопа *Salda littoralis*, не связан с образованием каких-либо клеточных ассоциатов или «почек» (Фролов, Подлипаев, 1996). У этого вида трипаносоматид родительские промастиготы, прикрепленные к эпителию средней кишки клопа-хозяина, претерпевают ряд бинарных делений, в ходе которых формируются расселительные «цисты».

Электронно-микроскопически «жгутиковые цисты» гомоксенных трипаносоматид изучены достаточно подробно у *Blastocrithidia triatomae*, *B. familiaris*, *Leptomonas lygaei* и *Leptomonas* sp. из клопа *Oncopeltus varicolor* (Mehlhorn et al., 1979; Schaub, Pretsch, 1981; Peng, Wallace, 1982; Tieszen et al., 1985, 1989; Schaub, Böker, 1986; Reduth, Schaub, 1988; Schaub et al., 1990; Takata et al., 1996). Тем не менее многие аспекты дифференцировки этого класса цистоподобных клеток до сих пор остаются малопонятными. В связи с этим в настоящем исследовании изучены тонкие механизмы образования «цист» у *Leptomonas oncopelti* в средней кишке клопов *Oncopeltus fasciatus*.

Жгутиконосцы *L. oncopelti* относятся к числу относительно хорошо изученных гомоксенных трипаносоматид. Так, вслед за первописанием *L. oncopelti* (Noguchi, Tilden, 1926) и определением систематического положения этого простейшего (Lwoff, Lwoff, 1931) с помощью экспериментальных методов был подробно прослежен его жизненный цикл (McGhee, Hanson, 1962; McGhee, Cosgrov, 1980). Однако на ультраструктурном уровне были исследованы только *L. oncopelti* в ректуме *O. fasciatus*, причем лишь отдельные стадии формирования «жгутиковых цист» этого паразита (Laugé, Nishioka, 1977). Нам удалось проследить дифференцировку цистоподобных клеток *L. oncopelti* более подробно.

Материал и методика

Клопы *Oncopeltus fasciatus*, зараженные трипаносоматидами *Leptomonas oncopelti*, были получены из Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений РАСХН (Санкт-Петербург). Насекомых содержали в лаборатории при комнатной температуре и 18-часовом световом дне. В качестве корма использовали семена подсолнечника масличного *Helianthus annuus*. Зараженными были все без исключения особи клопов. В световом микроскопе исследовали сухие мазки содержимого средней кишки насекомых, которые фиксировали 96%-ным этанолом и окрашивали по Романовскому—Гимза (рН 6.8).

Для электронной микроскопии кусочки средней кишки клопа, зараженного жгутиконосцами, фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида в 0.1 М какодильном буфере (2 ч, 4 °С). После отмывки в 0.1 М какодильном буфере, содержащем 5 % сахарозы, материал постфиксировали в 2%-ном водном растворе OsO₄ (1 ч, 4 °С), обезвоживали и заключали в смесь Аралдита с Эпоном. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB III. Срезы окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца и изучали в электронных микроскопах JEM-100С и JEM-100S.

Результаты

Субпопуляция жгутиконосцев *Leptomonas oncopelti* в средней кишке клопа *Oncopeltus fasciatus* в основном представлена промастиготами (рис. 1, а). Последние имеют ланцетовидную форму, длинный жгутик и кинетопласт, лежащий перед ядром. Большинство промастигот размножаются делением на две сходные по размерам и морфологии клетки. Клеточная перетяжка образуется на переднем конце жгутиконосца, дочерние ядра в митозе расходятся вдоль поперечной оси клетки, а борозда деления проходит между ядрами (рис. 1, а).

В задней части средней кишки клопа только часть клеток лептомонад размножается описанным выше образом, в то время как другая их часть переходит к делениям другого типа, приводящим к образованию цистоподобных амастигот (рис. 1, б; 2, а—е). «Инцистирование» начинается с неравного деления материнской промастиготы, которая, как правило, не прикрепляется к эпителиальной выстилке кишечника. При этом жгутик меньшей, дочерней, клетки, формирующийся *de novo*, не выходит за пределы жгутикового кармана большей, материнской, особи. После завершения митоза дочерние ядра располагаются вдоль продольной оси делящейся особи (рис. 1, б). Борозда деления закладывается на латеральной поверхности передней половины большей по размеру материнской клетки и постепенно смещается к ее апикальному концу. В результате этого процесса отделяется дочерняя клетка — клетка С1. Передний конец клетки С1 сохраняет связь со жгутиком материнской клетки и после завершения цитокинеза (рис. 1, б; 2, а, в). В остальном материнская и дочерняя клетки имеют сходные морфологию и ультратонкое строение (рис. 2, а, в).

На следующих этапах формирования «жгутиковых цист» промастигота не делится, а клетка С1 делится дважды, в результате чего сначала образуются две равные по размеру клетки С2 (стадия 2 формирования «жгутиковых цист»), а затем розетка из четырех мелких мор-

фологически сходных клеток С3 (стадия 3 формирования «жгутиковых цист») (рис. 1, б; 2, б, з—е; 3, а). В процессе этих делений обособление клеток С2 и С3 происходит от заднего полюса делящейся особи к переднему. На препаратах клеток С2 и С3, окрашенных по Романовскому—Гимза, выявляются ядра и кинетопласты (рис. 2, б). Жгутики у этих клеток светооптически не обнаруживаются, а передние концы дочерних особей остаются прикрепленными друг к другу и к жгутику материнской промастиготы.

Электронно-микроскопические исследования позволили вскрыть механизм, удерживающий псевдоинцистирующиеся клетки на жгутике материнской промастиготы. На рис. 2, з представлены две клетки С2 и фрагмент жгутика материнской клетки. Видно, что цитоплазма клеток С2 значительно плотнее цитоплазмы материнской промастиготы и клетки С1 (ср. рис. 2, в и з). Из редуцированных жгутиковых карманов клеток С2 вместо типичных жгутиков выступают короткие цитоплазматические выросты (рис. 2, з). Последние имеют неправильную форму, заполнены тонкофибрилярным матриксом и не содержат аксонемы и параксиального тяжа. Между основанием цитоплазматического выроста и кинетопластом обычно выявляется кинетосома (рис. 2, з). Короткие цитоплазматические выросты клеток С2 плотно прилегают друг к другу, причем в зоне контакта с цитоплазматической стороны каждого выроста формируются зональные десмосомы. Десмосома также обнаруживается в участке прикрепления цитоплазматического выроста одной из клеток С2 к жгутику материнской промастиготы (рис. 2, з).

Как уже отмечалось, деление двух клеток С2 приводит к образованию розетки из четырех овальных клеток С3 (рис. 2, б). Такая розетка остается прикрепленной к жгутику материнской промастиготы длительное время. Клетки С3 мельче клеток С2, и цитоплазма их еще более плотная (ср. рис. 2, з и д, е; 3, а, в). У клеток С3 редуцированный жгутиковый карман, локализующийся на апикальном конце, укорачивается и приобретает вид неглубокой ямки (рис. 2, е; 3, а), от дна которой отходит маленький, расширяющийся на конце цитоплазматический вырост. Кинетосом у клеток С3 не обнаружено. Клетки С3 в составе розетки удерживаются также при помощи зональных десмосом, которые формируются в области контактов цитоплазматических выростов друг с другом (рис. 2, е; 3, а, б). При этом вырост одной из клеток С3 по-прежнему сохраняет связь со жгутиком материнской промастиготы (рис. 3, а). В области зональных десмосом плазматические мембраны контактирующих цитоплазматических выростов отстоят друг от друга на расстоянии около 20 нм. Промежуток между мембранами заполнен тонкофибрилярным матриксом, а к внутренней стороне этих плазмалемм прилегают слои плотного фибриллярного материала (рис. 3, а, б). Изредка в матриксе цитоплазматических выростов обнаруживаются неупорядоченные дубликаты микротрубочек, а одиночные микротрубочки и параксиальный тяж отсутствуют (рис. 3, а).

Клетки С3 демонстрируют необычную для трипаносоматид ультраструктурную организацию (рис. 2, д, е; 3, в). Митохондрия этих клеток лишена длинных периферических ветвей, а капсула кинетопласта становится более компактной по сравнению с клетками С1 и С2 (рис. 3, в, д). Нити кинетопластной ДНК, имеющие у клеток С2 еще характерную для трипаносоматид петлеобразную упаковку (рис. 3, з), у клеток С3 постепенно сли-

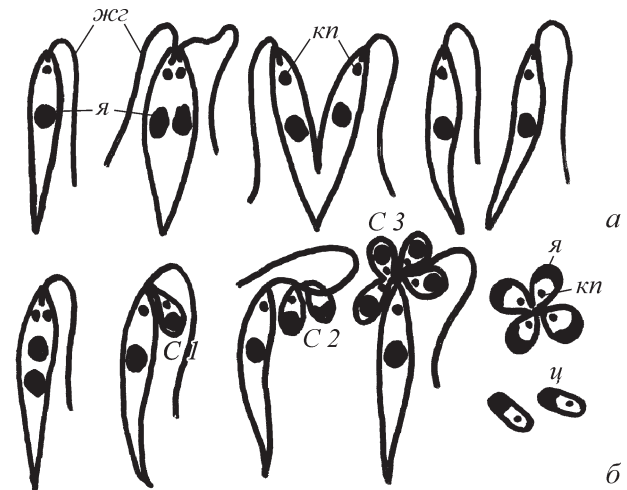


Рис. 1. Схема двух типов деления *Leptomonas oncopelti* в средней кишке *Oncopeltus fasciatus*.

а — обычное бинарное деление промастигот; б — деления паразитов, приводящие сначала к образованию «жгутиковых цист», а затем зрелых «цист». жсг — жгутик промастигот; кп — кинетопласт; С1, С2 и С3 — клетки лептомонад 1, 2 и 3-го поколений, образующиеся при формировании «жгутиковых цист»; ц — зрелые «цисты»; я — ядро.

Fig. 1. Schematic drawing of two division types of *Leptomonas oncopelti* in the midgut of *Oncopeltus fasciatus*.

а — typical binary fission of promastigotes; б — cell divisions resulting, respectively, in formation of straphangers and mature «cyst». жсг — жгутик промастигот; кп — кинетопласт; С1, С2 и С3 — клетки лептомонад 1, 2 и 3-го поколений, образующиеся при формировании «жгутиковых цист»; ц — зрелые «цисты»; я — ядро.

паются друг с другом (рис. 3, д) и в конце концов формируют плотную неструктурированную массу у зрелых «цист» (рис. 3, е).

У «инцистирующихся» *L. oncopelti* размер ядра постепенно уменьшается. Так, если диаметр ядра у материнской промастиготы составляет около 2.3 мкм, то у клеток С3 — не более 1.5 мкм. Тонкое строение ядра клеток С1 и С2 еще мало отличается от тонкого строения ядра материнской промастиготы (рис. 4, а, б). В интерфазе ядро всех этих клеточных форм, как правило, содержит одно центральное ядрышко и слой периферического конденсированного хроматина шириной около 50 нм (рис. 4, а). Иногда отдельные широкие хроматиновые тяжи ответвляются в центральную область кариоплазмы. В ходе митоза периферический хроматин декомпактизируется, а ядрышко фрагментируется (рис. 4, б). В матриксе делящегося ядра выявляются кинетохороподобные бляшки, связанные с фибриллами деконденсированного хроматина, и немногочисленные микротрубочки ахроматинового веретена (рис. 4, б). В клетках С3, которые утрачивают способность к делению, наблюдаются заметные изменения ультраструктуры ядра (рис. 4, в—д). Степень конденсации хроматина в клетках С3 по сравнению с промастиготами и клетками С1 и С2 значительно усиливается (рис. 4, в). Анастомозирующие тяжи хроматина в ядрах клеток С3 постепенно заполняют большую часть центральной кариоплазмы. Ядрышко в клетках С3 сохраняется, однако оно состоит преимущественно из фибриллярного компонента (рис. 4, в). В дальнейшем в ядрах клеток С3 примембранный хроматин трансформируется в характерную «лабиринтоподобную структуру», которая представляет собой мощный сложно организованный пучок извитых фибрилл толщиной 3—5 нм

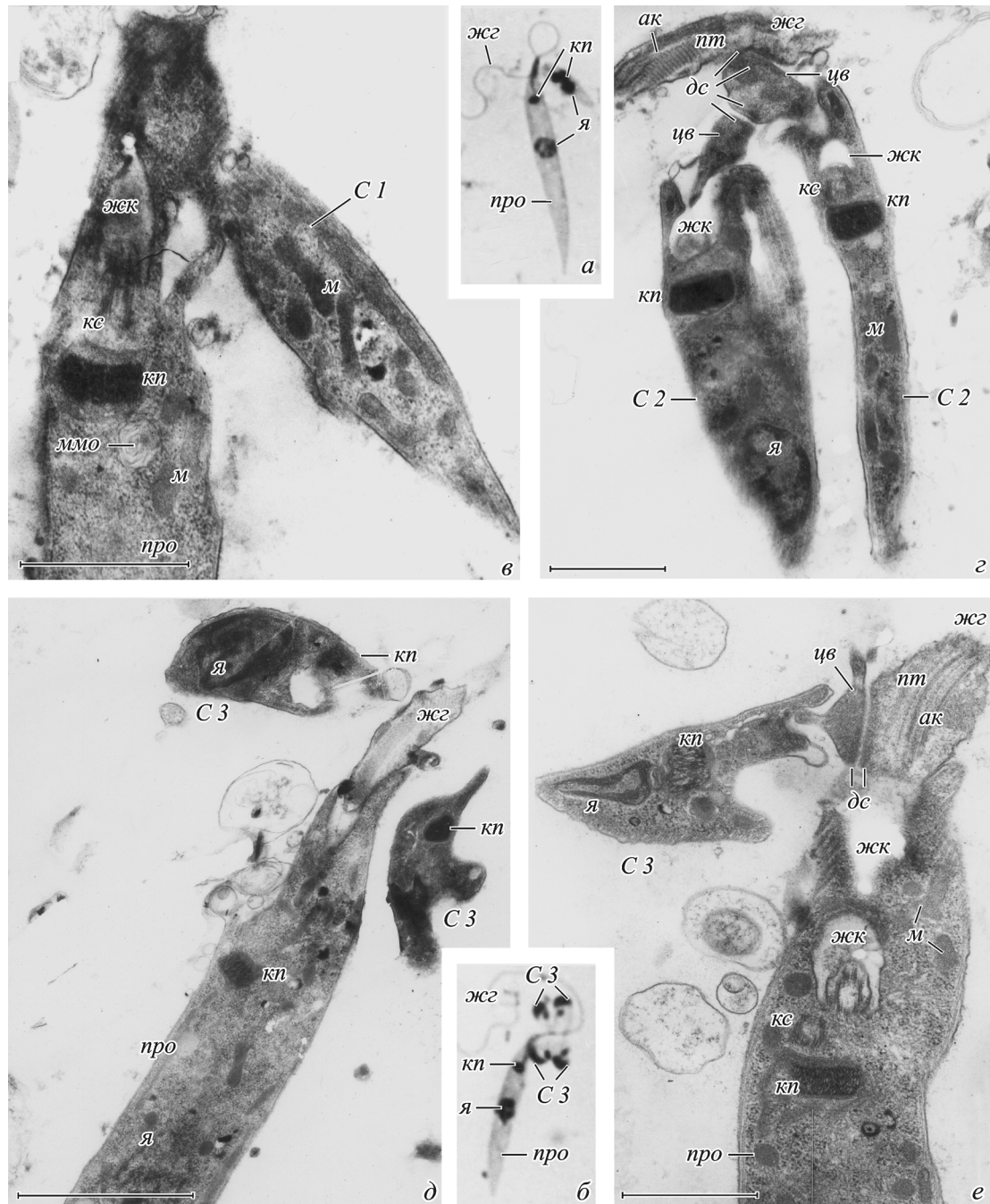


Рис. 2. Стадии формирования «жгутиковых цист» *Leptomonas oncopelti* в средней кишке *Oncopeltus fasciatus*.

a, в — родительская промастигота и дочерняя клетка C1; *б, д, е* — клетки C3; *г* — клетки C2. *ак* — аксонема, *дс* — десмосома, *жк* — жгутиковый карман, *кс* — кинетосома, *м* — митохондрия, *мм* — мультимембранное образование, *про* — промастигота, *нт* — параксиальный тяж, *цв* — цитоплазматический вырост; остальные обозначения те же, что и на рис. 1. *а, б* — окраска по Романовскому—Гимза, об. 100×, ок. 10×; *в—е* — электронограммы. Масштабные линейки: *в, г, е* — 1 мкм; *д* — 2 мкм.

Fig. 2. Stages of «cyst» (straphanger) formation of *Leptomonas oncopelti* in the midgut of *Oncopeltus fasciatus*.

a, в — maternal promastigote and daughter cell C1; *б, д, е* — cells C3; *г* — cells C2. *ак* — axoneme, *дс* — desmosome, *жк* — flagellar pocket, *кс* — kinetosome, *м* — mitochondrion, *мм* — multimembrane structure, *про* — promastigote, *нт* — paraxial rod, *цв* — cytoplasmic outgrowth. Other designations are the same as in Fig. 1. *a, б* — light microscopy of Romanowski—Giemsa stained smears, ob. 100×, oc. 10×; *в—е* — electron micrographs. Bars: *в, г, е* — 1 μm; *д* — 2 μm.

(рис. 4, *г*). На поперечном срезе внутри пучка хроматиновых фибрилл видны каналы диаметром 10—12 нм, заполненные кариоплазмой (рис. 4, *д*). После отделения клеток C3 от жгутика материнской промастиготы и партнеров по розетке и превращения клеток C3 в зрелые «цисты» плотный хроматин заполняет большую часть ядра

этих «цист» (рис. 4, *е*). При этом в центре хроматинового комплекса, который утрачивает различимую структурированность, располагается небольшая лакуна, заполненная кариоплазмой (рис. 4, *е*).

В ультраструктуре ядерной оболочки клеток C3 также происходят существенные изменения. Так, если у ма-

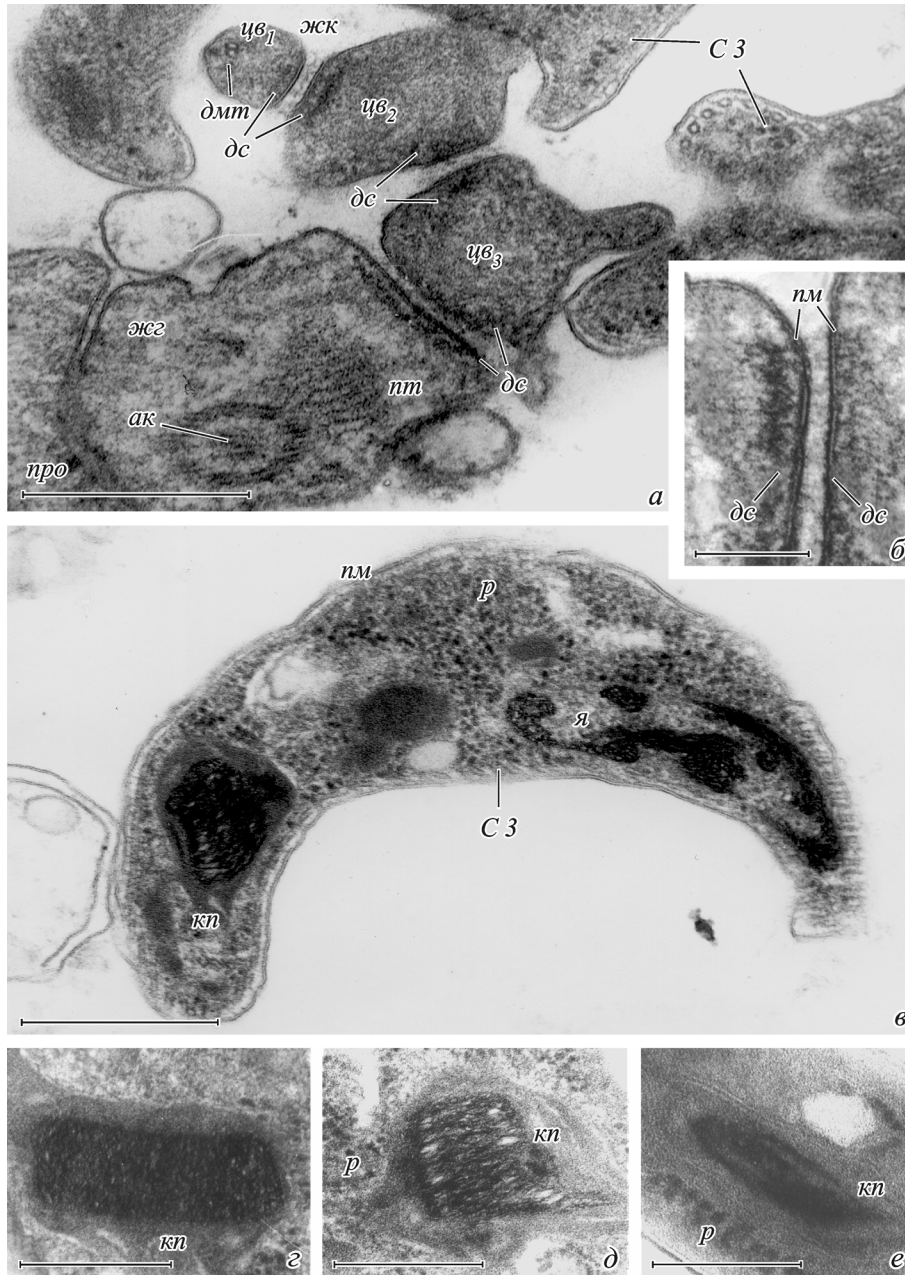


Рис. 3. Цистоподобные клетки *Leptomonas oncopelti* в средней кишке *Oncopeltus fasciatus*.

a — прикрепление цитоплазматических выростов клеток C3 друг к другу и к жгутику материнской промастиготы; *б* — фрагмент зональной десмосомы; *в* — клетка C3; *г–е* — этапы трансформации кинетопласта в ходе образования «цист». *дмт* — дубликат микротрубочек аксонемы, *нм* — плазмалемма, *р* — рибосомы; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2. Масштабные линейки: *a, в* — 0,5 мкм; *б* — 0,1 мкм; *г, д* — 0,3 мкм; *е* — 0,2 мкм.

Fig. 3. Cyst-like cells of *Leptomonas oncopelti* in the midgut of *Oncopeltus fasciatus*.

a — attachment of cytoplasmic outgrowths of cells C3 to each other and to the maternal promastigote flagellum; *б* — fragment of zonal desmosome; *в* — cell C3; *г–е* — transformation of kinetoplast at different stages of «cyst» formation. *дмт* — duplicate of axonemal microtubules, *нм* — plasmalemma, *р* — ribosomes. Other designations are the same as in Figs 1 and 2. Bars: *a, в* — 0.5 μm; *б* — 0.1 μm; *г, д* — 0.3 μm; *е* — 0.2 μm.

теринской промастиготы (рис. 4, *a*), клеток C1 и C2 ядро окружено двумя мембранами обычного строения, разделенными перинуклеарным пространством, то ядра клеток C3 на поздних этапах псевдоинцистирования (рис. 4, *д*) и ядра зрелых «цист» (рис. 4, *е*) ограничены весьма необычными трехслойными «мембранами», средний слой которых более электронно-плотный, чем оба наружных слоя. Ядерные поры в клетках C3 и зрелых «цистах» не видны (рис. 4, *д, е*).

Материнская промастигота, клетки C1 и C2 окружены типичной трехслойной плазматической мембраной толщиной около 7 нм (рис. 5, *a; б, a*). На поверхности этой плазмалеммы обычно выявляется слой тонкофибрилярного гликокаликса толщиной около 5 нм. К внутреннему слою плазмалеммы прилегает слой мелкозернистой цитоплазмы шириной около 40 нм (рис. 5, *a*). Этот слой лишен рибосом и содержит один ряд субпелликулярных микротрубочек (рис. 5, *a; б, a*).

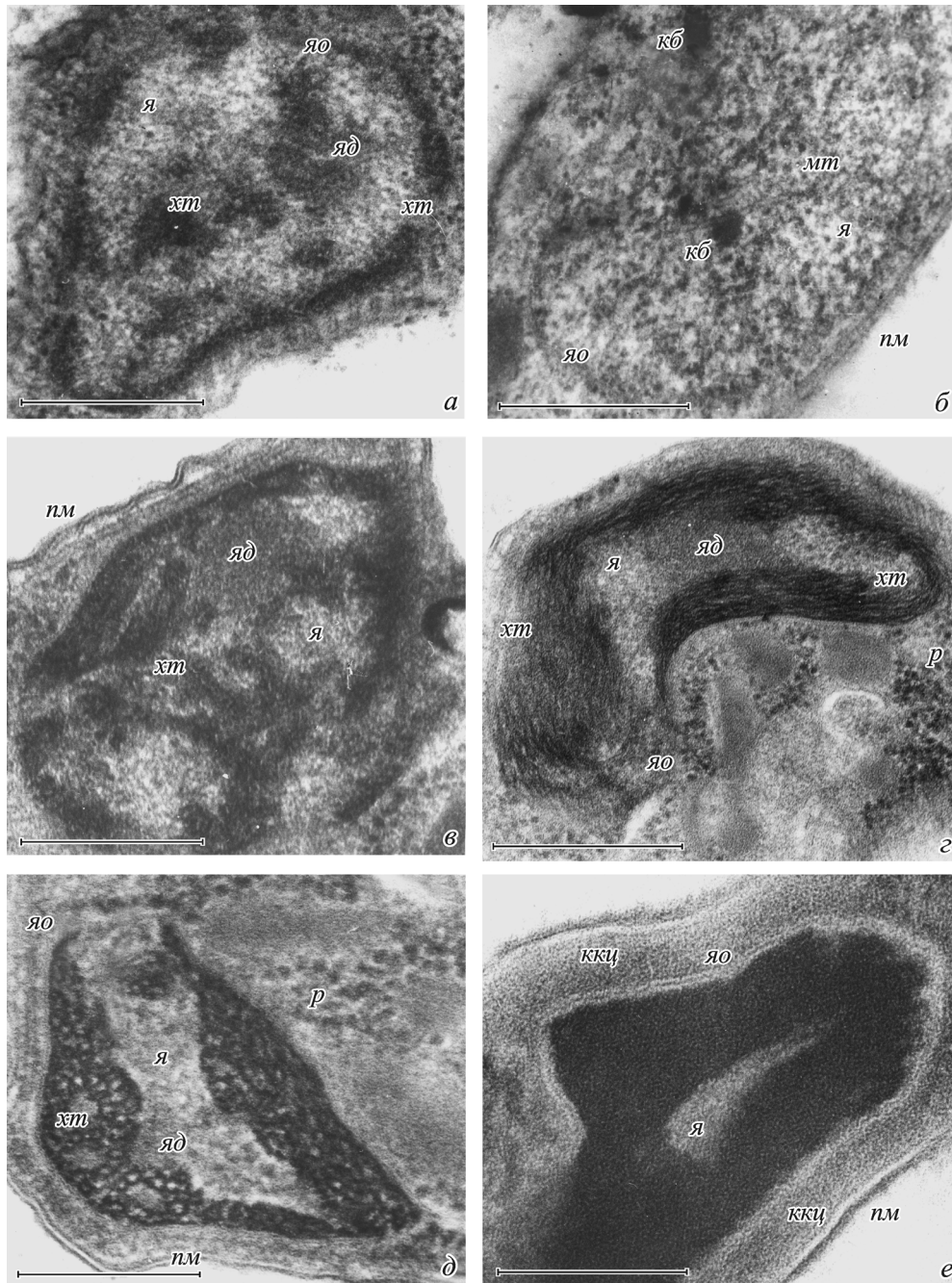


Рис. 4. Ультраструктура ядра родительской промастиготы, «жгутиковых цист» и зрелых «цист» *Leptomonas oncopelti*.

a — ядро промастиготы в интерфазе; *б* — ядро промастиготы в митозе; *в—д* — ядра клеток СЗ; *е* — ядро зрелой «цисты». *кб* — кинетохороподобная бляшка, *ккц* — кортикальный комплекс зрелых «цист», *мт* — микротрубочка, *хт* — хроматин, *яд* — ядрышко, *яо* — ядерная оболочка; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 3. Масштабные линейки: *a, б* — 0,5 мкм; *в, г* — 0,3 мкм; *д* — 0,2 мкм; *е* — 0,1 мкм.

Fig. 4. Fine structure of the nucleus in maternal promastigote, straphangers and mature «cysts» of *Leptomonas oncopelti*.

a — nucleus of promastigote at interphase; *б* — nucleus of promastigote in mitosis; *в—д* — nuclei of cells СЗ; *е* — nucleus of a mature «cyst». *кб* — kinetochore-like plaque, *ккц* — cortical complex of mature «cysts», *мт* — microtubule, *хт* — chromatin, *яд* — nucleolus, *яо* — nuclear envelope. Other designations are the same as in Figs 1 and 3. Bars: *a, б* — 0.5 μ m; *в—г* — 0.3 μ m; *д* — 0.2 μ m; *е* — 0.1 μ m.

В периферических отделах клеток СЗ *L. oncopelti* происходят существенные структурные изменения (рис. 5, *б, в*; 6, *б, в*), которые в конце концов приводят к образованию у зрелых «цист» сложного кортикального комплекса (рис. 5, *г—е*; 6, *г*). Изменения на периферии клеток СЗ начинаются с утолщения всех трех слоев плазмалеммы. При этом у зрелых цистоподобных клеток

L. oncopelti ширина наружного слоя плазмалеммы достигает 9 нм (рис. 5, *г—е*). По-видимому, утолщение этого слоя плазмалеммы достигается за счет его объединения со слоем гликокаликса. Интересно, что в зрелых «цистах» утолщение среднего слоя плазмалеммы в отличие от наружного и внутреннего слоев этой мембраны связано со снижением электронной плотности (рис. 5, *д*).

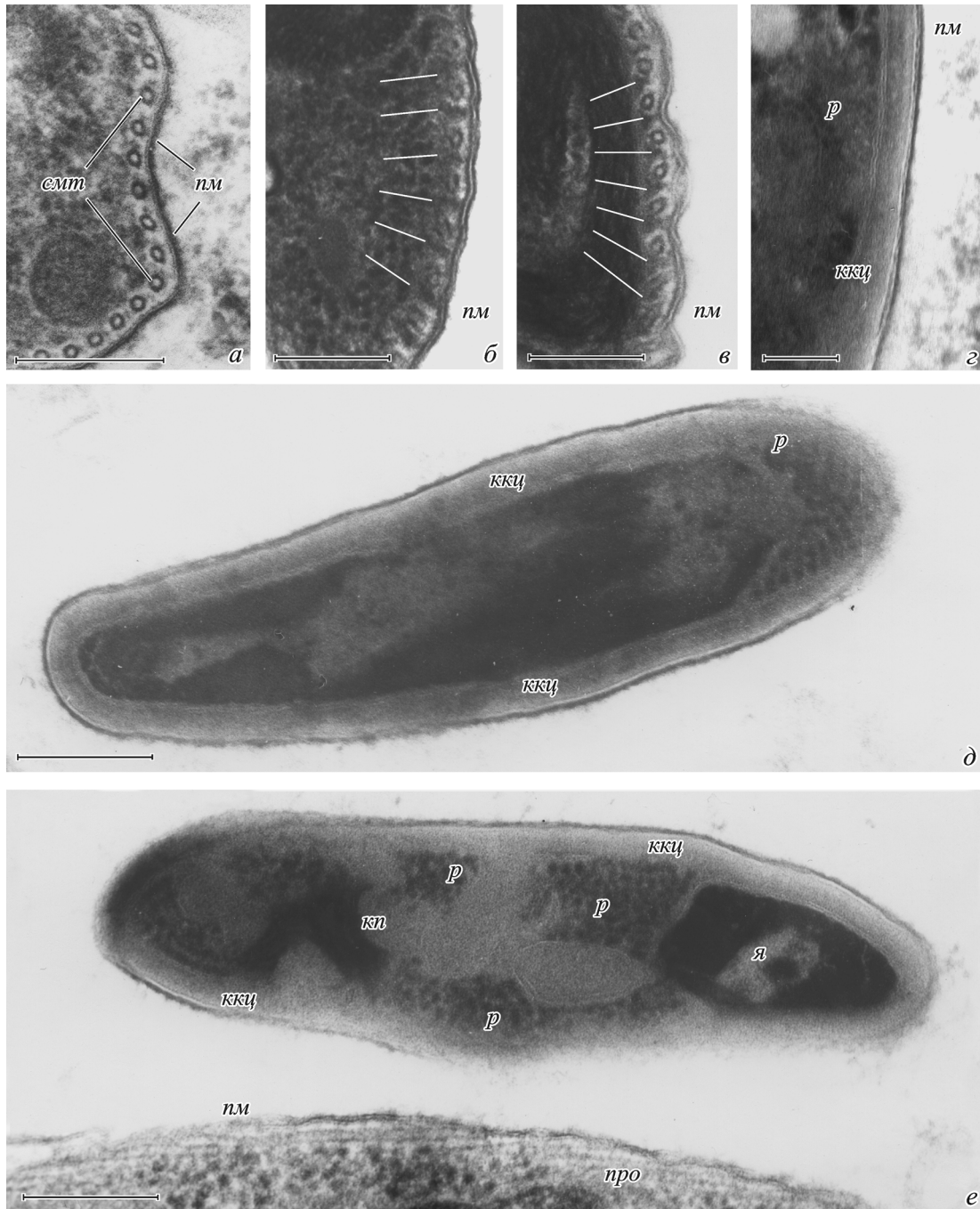


Рис. 5. Ультраструктура цитоплазмы промастигот, «жгутиковых цист» и зрелых «цист» *Leptomonas oncopelti*.

a — эктоплазма промастиготы; *б, в* — этапы образования сложного кортикального комплекса у клеток С3; *з—е* — зрелые «цисты». *с.м.т.* — субпелликулярные микротрубочки. Белыми линиями обозначен мелкозернистый матрикс; остальные обозначения те же, что и на рис. 1—4. Масштабные линейки: *a—з* — 0,2 мкм; *д, е* — 0,3 мкм.

Fig. 5. Ultrastructure of the cytoplasm in promastigotes, straphangers and mature «cysts» of *Leptomonas oncopelti*.

a — ectoplasm of promastigote; *б, в* — stages of cortical complex formation in cells C3; *з—е* — mature «cysts». *с.м.т.* — subpellicular microtubules. White lines — fine granular matrix. Other designations are the same as in Figs 1—4. Bars: *a—з* — 0.2 μm; *д, е* — 0.3 μm.

Слой мелкозернистой цитоплазмы, прилегающий к внутренней поверхности плазмалеммы клеток С3, постепенно уплотняется и толщина его в конце концов достигает 60 нм (рис. 5, *б, в*; 6, *б, в*). При этом уплотнение слоя мелкозернистой цитоплазмы начинается на границе с эндоплазмой, затем это уплотнение распространяется между субпелликулярными микротрубочками и только пос-

ле этого достигает внутренней поверхности плазмалеммы (рис. 5, *б, в*; 6, *б, в*). В зрелых «цистах» субпелликулярные микротрубочки перестают идентифицироваться (рис. 5, *з—е*; 6, *з*). Таким образом, хотя у зрелых «цист» *L. oncopelti* нет такой наружной стенки, как у настоящих цист других протистов, ее функции выполняет сложный кортикальный комплекс, который состоит из

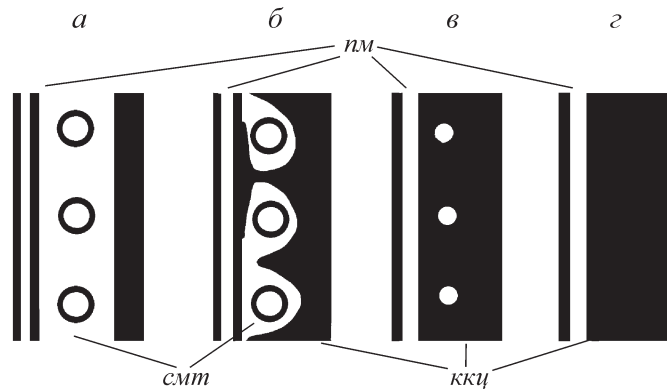


Рис. 6. Схема образования сложного кортикального комплекса у *Leptomonas oncopelti*.

а — промастигота; б, в — клетки С3; г — зрелая «циста». ккц — кортикальный комплекс зрелых «цист», нм — плазмалемма, смм — субпелликулярные микротрубочки.

Fig. 6. Schematic drawing of successive stages of cortical complex formation in *Leptomonas oncopelti*.

а — promastigote; б, в — cells C3; г — mature «cysts». ккц — cortical complex of mature «cysts», нм — plasmalemma, смм — subpellicular microtubules.

утолщенной плазматической мембраны и подлежащего слоя плотной мелкозернистой цитоплазмы (рис. 5, г—е; б, г).

Эндоплазма зрелых «цист» характеризуется высокой электронной плотностью, поэтому органеллы в ней, как правило, выявить не удастся (рис. 5, д, е). Лишь иногда в «цистах» различаются ядерная и кинетопластная области, внутренние зоны, сходные по структуре и плотности со слоем мелкозернистой кортикальной цитоплазмы, участки с плотно упакованными рибосомами и необычные трехслойные мембраны, срединный слой которых более электронно-плотный, чем наружные слои (рис. 5, г—е).

Обсуждение

В настоящей работе установлено, что в жизненном цикле *L. oncopelti* формирование зрелых цистоподобных клеток начинается с неравного деления подвижных жгутиконосцев в задних отделах средней кишки клопа *Oncopeltus fasciatus*. Важным этапом созревания «цист» является образование трех промежуточных форм, обозначенных нами как клетки С1, С2 и С3, которые представляют собой не что иное, как типичные «жгутиковые цисты» гомоксенных трипаносоматид (первый способ образования «цист»; см. вводную часть статьи).

Впервые изучен механизм прикрепления «жгутиковых цист» друг к другу и к жгутику материнской промастиготы. Оказалось, что у клеток С1—С3 вместо типичных жгутиков формируются короткие цитоплазматические выросты, лишённые аксонем. В участках контактов этих выростов между собой и со жгутиком родительской промастиготы формируются зональные десмосомы. По-видимому, именно десмосомы обеспечивают ассоциацию четырех овальных «жгутиковых цист» С3 и прикрепление ассоциата к ундулиподию жгутика промастиготы. Не исключено, что существование мини-розеток из 2—4 «жгутиковых цист», обнаруженных ранее в жизнен-

ных циклах лептомонады *Leptomonas lygaei* (Tieszen et al., 1989) и некоторых бластокритидий, например *Blastocrithidia triatomae* (Mehlhorn et al., 1979; Peng, Wallace, 1982; Schaub, Böker, 1986) и *B. familiaris* (Tieszen et al., 1985), обеспечивается также клеточными контактами типа десмосом.

По ряду признаков первый и второй способы формирования цистоподобных клеток гомоксенных трипаносоматид (см. вводную часть статьи) сходны между собой. Так, в обоих случаях в определенных фазах жизненного цикла паразитов формируются розетковидные клеточные ассоциаты, которые удерживаются вместе при помощи десмосом, образующихся в местах контакта видоизмененных жгутиков этих простейших. Однако многие другие аспекты первого и второго способов формирования «цист» гомоксенных трипаносоматид существенно различаются. Эти различия касаются числа особей в ассоциатах, а также особенностей трансформации ядра, органелл цитоплазмы и структурных элементов кортикального комплекса псевдоинцистирующихся паразитов. К сожалению, малое число видов гомоксенных трипаносоматид, у которых с помощью электронного микроскопа были изучены цистоподобные клетки, не всегда позволяет судить о функциональной значимости этих сходств и различий.

Цистоподобные клетки *L. oncopelti* и некоторых других гомоксенных трипаносоматид по существу являются аналогами метациклических форм гетероксенных трипаносоматид. Так, «жгутиковые цисты» бластокритидий и лептомонад, как и метациклические формы трипаносом и лейшманий, служат для заражения своих хозяев. Ранее было замечено (Molyneux, 1977; Molyneux, Ashford, 1983), а в ряде случаев доказано, например для эпимастигот *Trypanosoma congolense* (Hendry, Vickerman, 1988), что в беспозвоночных хозяевах перед образованием подвижных метациклических форм трипаносом обязательно происходит прикрепление жгутиконосцев к эпителиальным выстилкам пищеварительной системы переносчика. Это прикрепление обычно осуществляется с помощью видоизмененных ундулиподий жгутиков, у поверхности которых нередко формируются десмосомы, полудесмосомы или другие подобные им клеточные контакты (Molyneux, 1977; Molyneux, Ashford, 1983). Как уже неоднократно отмечалось выше, у *L. oncopelti* и других видов гомоксенных трипаносоматид объединение паразитов во временные клеточные ассоциаты типа мини-розеток также происходит при помощи видоизмененных жгутиков, каковыми являются короткие цитоплазматические выросты, причем в местах прикрепления этих выростов друг к другу формируются зональные десмосомы (Loučková, 1974; Abe, 1980; Molyneux, Croft, 1980; Фролов, Скарлато, 1990а, 1990б; Фролов и др., 1991; настоящее исследование). Получается, что без фазы прикрепления паразитов друг к другу цистоподобные клетки лептомонад и бластокритидий не образуются. При этом не столь уж важно, много или мало паразитов образуют клеточный ассоциат. По-видимому, важным стимулом к дифференцировке цистоподобных форм трипаносоматид является само прикрепление паразита с помощью жгутика, обычно видоизмененного, к какому-либо субстрату (Фролов, Скарлато, 1990а). Представляет большой интерес выяснение вопроса о том, какие еще факторы влияют на запуск дифференцировки, приводящей к формированию цистоподобных клеток и других расселительных форм трипаносоматид. Имеется наблю-

дение, что при голодании клопов-хозяев жгутиконосцы *Blastocrithidia triatomae* формируют необычно большое число «цист» (Schaub et al., 1990). Однако, например, жгутиконосцы *Leptomonas jaculum* образуют приблизительно одинаковое число «цист» в пищеварительном тракте как голодных, так и регулярно питающихся клопов-хозяев (Фролов и др., 1991). Показано, что образование расселительных форм трипаносом, например *Trypanosoma cruzi*, стимулируется под влиянием циклической АМФ, ряда ее производных и некоторых аминокислот (Homsy et al., 1989). Интересно было бы проверить влияние этих химических соединений на дифференцировку цистоподобных клеток лептомонад и бластокритидий.

Установлено, что при формировании «цист» *L. oncopelti* происходит прогрессирующая конденсация ядерных структур, кинетопласта и других цитоплазматических органелл, большинство которых перестает выявляться на ультратонких срезах «цист». При этом если на промежуточных этапах формирования псевдоцист (в клетках С1 и С2) многие органеллы и субкомпарменты клетки, такие как ядерная оболочка, кинетопласт, митохондрия, аппарат Гольджи и элементы жгутикового аппарата, еще выявляются, то на более поздних этапах «цистообразования» поры в оболочке ядер уже не видны, а перинуклеарное пространство становится равномерно узким и содержит необычно плотный для этого ядерного субкомпармента материал. Сходные наблюдения были сделаны при изучении формирования «цист» *B. triatomae* с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Несколько больше информации о тонкой организации цистоподобных клеток *B. triatomae* дал метод замораживания—скальвания в сочетании с электронной микроскопией (Reduth, Schaub, 1988). С помощью этого метода в зрелых «цистах» паразита удалось различить ядерную оболочку, ядерные поры диаметром около 90 нм, кинетопласт, аппарат Гольджи и множество пузырьков разной природы, «замаскированных» в плотном цитоплазматическом матриксе. Кроме того, оказалось, что структура протоплазматической поверхности (PF) плазмалеммы «цисты» *B. triatomae* сходна с таковой бактерий, а не со структурой плазмалеммы других эукариот, включая трипаносоматид (Reduth, Schaub, 1988; Schaub et al., 1990).

В процессе псевдоцистообразования структура хроматина *L. oncopelti* существенно изменяется — образуется характерная «лабиринтоподобная структура», представляющая собой мощный извитой тяж, состоящий из хроматиновых фибрилл, которые занимают большую часть внутриядерного пространства клеток С3. Помимо *L. oncopelti* преобразование примембранного ядерного хроматина в «лабиринтовидную структуру» отмечено и у других видов гомоксенных трипаносоматид, формирующих «жгутиковые цисты» (Mehlhorn et al., 1979; Tieszen et al., 1985; Фролов, Подлипаев, 1996; Скарлато, 2003). Высказано предположение о том, что хроматиновые элементы, составляющие эту ядерную структуру у лептомонад и бластокритидий, представляют собой специфические хромосомоподобные комплексы, формирующиеся только в процессе образования цистоподобных клеток (Skarlato et al., 1993). Интересно, что у зрелых «цист» выявить какую-либо структурированность хроматина, как правило, не удается.

Особого внимания заслуживает строение характерного кортикального комплекса зрелых цист *L. oncopelti*. Этот защитный комплекс *L. oncopelti*, как и кортикаль-

ный комплекс цистоподобных клеток *L. lygaei* (Tieszen et al., 1989), состоит из утолщенной плазматической мембраны и подлежащего слоя плотной мелкозернистой цитоплазмы, лишенной характерных для трипаносоматид кортикальных микротрубочек. Интересно, что в «цистах» некоторых других гомоксенных трипаносоматид, например *B. triatomae* (Mehlhorn et al., 1979; Schaub, Pretsch, 1981; Peng, Wallace, 1982; Reduth, Schaub, 1988) и *B. familiaris* (Tieszen et al., 1985), под утолщенной плазматической мембраной в слое мелкозернистой цитоплазмы выявляются кортикальные гранулы, которые образуются на месте субпелликулярных микротрубочек. При этом у *B. triatomae* и *B. familiaris* кортикальная цитоплазма начинает уплотняться у самой поверхности плазматической мембраны и ее уплотнение постепенно распространяется в глубь клетки (Peng, Wallace, 1982; Tieszen et al., 1985). Напротив, у *L. oncopelti* уплотнение кортикальной цитоплазмы прогрессирует в противоположном направлении — от наружной области эндоплазмы к плазмалемме. Таким образом, формирование защитного кортикального комплекса псевдоцист у гомоксенных трипаносоматид, по-видимому, специфично для этой группы простейших.

Установлено, что кортикальный комплекс позволяет зрелым «цистам» паразитов после выведения из организма хозяина во внешнюю среду длительное время, иногда годами сохранять жизнеспособность до момента заражения нового хозяина (Schaub, Pretsch, 1981; Фролов, Скарлато, 1991, и др.). Экспериментально показано, что «цисты» *B. triatomae* устойчивы к высушиванию по крайней мере в течение 3 лет, а также выдерживают длительную обработку детергентами (Schaub, Pretsch, 1981; Schaub et al., 1990). По-видимому, кортикальный комплекс цистоподобных клеток гомоксенных трипаносоматид выполняет защитные функции ничуть не хуже, чем внеклеточная оболочка настоящих цист других простейших. Необходимы дальнейшие исследования защитного кортикального комплекса «цист» трипаносоматид с привлечением современных методов клеточной и молекулярной биологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49209).

Список литературы

- Догель В. А. 1947. Курс общей паразитологии. 2-е изд. Л.: Учпедгиз. 372 с.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. 1987. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Паразитология. 21 (4): 545—552.
- Скарлато С. О. 2003. Слабоконденсирующиеся хромосомы простейших: Автореф. докт. дис. СПб. 41 с.
- Фролов А. О. 1987. Жизненный цикл *Blastocrithidia miridarum* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Зоол. журн. 66 (5): 655—661.
- Фролов А. О., Малышева М. Н., Подлипаев С. А. 1997. Необычный способ формирования цистоподобных стадий у бластокритидий (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), паразитирующих в кишечном тракте клопов-водомеров (Hemiptera, Gerriidae). Паразитология. 31 (4): 356—363.
- Фролов А. О., Подлипаев С. А. 1996. Необычный способ формирования инвазионных стадий у *Leptomonas rigidus* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Паразитология. 30 (6): 473—477.

- Фролов А. О., Скарлато С. О. 1990а. Структура розетко-видных клеточных ассоциатов у низших трипаносоматид. Цитология. 32 (5) : 455—461.
- Фролов А. О., Скарлато С. О. 1990б. Дифференцировка цистоподобных клеток паразитического жгутиконосца *Leptomonas mucophilus* in vitro. Цитология. 32 (10) : 985—992.
- Фролов А. О., Скарлато С. О. 1991. Описание *Leptomonas mucophilus* sp. n. (Trypanosomatidae) — паразита клопа *Phytocoris* sp. (Miridae). Паразитология. 25 (2) : 99—103.
- Фролов А. О., Скарлато С. О., Шаглина Е. Г. 1991. Морфология цистоподобных клеток жгутиконосцев *Leptomonas jaculum*. Цитология. 33 (10) : 55—58.
- Abe Y. 1980. On the encystment of *Leptomonas* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a parasite of the silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus. J. Protozool. 27 : 372—374.
- Gibbs A. J. 1950. *Crithidia familiaris* n. sp. in *Cenaesus carnifex* Fabr. (Hemiptera). Parasitology. 40 : 322—327.
- Hendry K. A. K., Vickerman K. 1988. The requirement for epimastigote attachment during division and metacyclogenesis in *Trypanosoma congolense*. Parasitol. Res. 74 : 403—408.
- Homsy J. J., Granger B., Krassner S. M. 1989. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 36 : 150—153.
- Laugé G., Nishioka R. S. 1977. Ultrastructural study of the relations between *Leptomonas oncopelti* (Noguchi and Tilden), Protozoa, Trypanosomatidae, and the rectal wall of adults of *Oncopeltus fasciatus* Dallas, Hemiptera, Lygaeidae. J. Morphol. 154 : 291—306.
- Loučková M. 1974. The flagellate *Leptomonas* sp. in *Corixa punctata* (Hemiptera). J. Protozool. 21 : 457.
- Lwoff M., Lwoff A. 1931. Recherches sur la morphologie de *Leptomonas oncopelti* Noguchi et Tilden et *Leptomonas fasciculata* Novy, MacNeal et Torrey. Arch. Zool. Exp. Gen. 71 : 21—37.
- McGhee R. B., Cosgrove W. B. 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. Microbiol. Rev. 44 : 140—173.
- McGhee R. B., Hanson W. L. 1962. Growth and reproduction of *Leptomonas oncopelti* in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. J. Protozool. 9 : 488—493.
- Mehlhorn H., Schaub G. A., Peters W., Haberkorn A. 1979. Electron microscopic studies on *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al., 1971 (Trypanosomatidae). Tropenmed. Parasitol. 30 : 289—300.
- Molyneux D. H. 1977. Vector-parasite relationships in the Trypanosomatidae. Adv. Parasitol. 15 : 1—82.
- Molyneux D. H., Ashford R. W. 1983. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. London: Taylor, Francis. 294 p.
- Molyneux D. H., Croft S. L. 1980. Studies on the ultrastructure of candidate «cyst» in *Leptomonas* species of Siphonaptera. Z. Parasitenk. 63 : 233—239.
- Noguchi H., Tilden E. B. 1926. Comparative studies of herpetomonads and leishmanias. I. Cultivation of herpetomonads from insects and plants. J. Exp. Med. 44 : 307—325.
- Patton W. S. 1908. *Herpetomonas lygaei*. Arch. Protistenk. 13 : 1—18.
- Peng P. L. M., Wallace F. G. 1982. The cysts of *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al., 1971. J. Protozool. 29 : 464—467.
- Reduth D., Schaub G. A. 1988. The ultrastructure of the cysts of *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al., 1971 (Trypanosomatidae): a freeze-fracture study. Parasitol. Res. 74 : 301—306.
- Schaub G. A., Böker C. A. 1986. Scanning electron microscopic studies of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) in the rectum of *Triatoma infestans* (Reduviidae). J. Protozool. 33 : 266—270.
- Schaub G. A., Pretsch T. M. 1981. Ultrastructural studies on the excystment of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75 : 168—171.
- Schaub G. A., Reduth D., Pudney M. 1990. The peculiarities of *Blastocrithidia triatomae*. Parasitol. Today. 6 : 361—364.
- Skarlato S. O., Bobyleva N. N., Marakhova N. V. 1993. Chromosomes of the lower trypanosomatids. Abstr. IX Intern. Congr. protozool. Berlin. 119.
- Takata C. S. A., Camargo E. P., Milder R. V. 1996. Encystment and excystment of a trypanosomatid of the genus *Leptomonas*. Eur. J. Protistol. 32 : 90—95.
- Tieszen K. L., Molyneux D. H., Abdel-Hafez S. K. 1985. Ultrastructure of cyst formation in *Blastocrithidia familiaris* in *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae). Z. Parasitenk. 71 : 179—188.
- Tieszen K. L., Molyneux D. H., Abdel-Hafez S. K. 1989. Host-parasite relationships and cysts of *Leptomonas lygaei* (Trypanosomatidae) in *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae). Parasitology. 98 : 395—400.
- Wallace F. G. 1966. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp. Parasitol. 18 : 124—193.

Поступила 4 IV 2006

DEVELOPMENT OF CYST-LIKE CELLS OF THE FLAGELLATE *LEPTOMONAS ONCOPELTI* IN THE MIDGUT OF THE HEMIPTERAN *ONCOPELTUS FASCIATUS*

M. N. Malysheva,¹ A. O. Frolov,^{1,*} S. O. Skarlato²

¹ Zoological Institute RAS, and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

* e-mail: frolov@online.ru

The structure of cyst-like cells of *Leptomonas oncopelti* (Trypanosomatidae) found in the midgut of the bug *Oncopeltus fasciatus* (Lygaeidae) was examined with light and electron microscopy. The formation of «cysts» begins with an unequal division of active flagellates with promastigote configuration. Cytokinesis starts on the lateral side of the flagellate, and then the cleavage furrow moves toward the apical end of the cell. The anterior part of a smaller daughter cell, referred to as cell C1, remains associated with the flagellum of maternal promastigote. C1 divides twice to give rise first to two equivalent cells (C2), and then to four morphologically similar cells (C3). C2 join with each other, and afterwards C3 attach themselves as well via short cytoplasmic outgrowths, which appear instead flagella. In the point of outgrowth attachment of only one C2 and then of only one C3 to maternal flagellum zonal desmosomes occur. C1—C3 of *L. oncopelti* are similar to so-called straphangers (cyst-like parasites attached to the flagellum of maternal promastigote) known in some species of the genera *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. Basal bodies are present in C1 and C2 but not in C3. DNA fibrils in the kinetoplast lack their common circular configuration, they progressively condense to form a disordered mass. C3 chromatin becomes denser to acquire eventually a characteristic «labyrinthine structure» looking like a huge bundle of whorled filaments 3—5 nm width. Inside this bundle there are channels of 10—12 nm in diameter filled with karyoplasm. On becoming ovoid, C3 are separated from the maternal promastigote flagellum and diffe-

rentiate into mature «cysts». Straphangers C1—C3 and mature «cysts» lack any visible outer extracellular protective envelope (cyst wall). Instead, these cells have a cortical complex made of a reinforced plasmatic membrane underlined by a layer of a dense granular cytoplasm free of subpellicular microtubules. The mature «cyst» endoplasm shows a high electron density, and because of this identification of the majority of cellular organelles is next to impossible. Nevertheless, in both C3 and mature «cysts» some unusual membranes are seen composed of two electron lucent layers, with a single electron dense layer in between.

Key words: flagellates, trypanosomatids, cyst-like cells.

Abbreviations: cells C1, C2, C3 — trypanosomatid cells at stages 1, 2, 3 of formation of cyst-like cells (straphangers) formation.
