

А. А. АВАКЯН, И. А. МАНУКЯН

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СТАДИИ *L. tropica*

В последние годы широко используется метод тканевых культур для изучения возбудителя паразитарных болезней (токсоплазмоз, лейшманиоз и др.). Зарубежные авторы [3—7] исследовали в основном возбудителя висцерального лейшманиоза в клетках хозяина. С. М. Дегтяревой и Д. Н. Засухиным в 1959 г. [2] впервые было проведено изучение возбудителя кожного лейшманиоза в клетках культуры ткани. Е. М. Белова [1] в 1962 г. проводила изучение в культуре ткани куриных фибробластов различных видов и штаммов лейшманий.

Целью нашего исследования явилось изучение субмикроскопической организации возбудителя кожного лейшманиоза на всех стадиях его внутриклеточного развития, установление тонких взаимоотношений между паразитом и клеткой хозяина, выяснение степени цитопатогенного действия в связи с развитием и размножением лейшманий в клетках культуры ткани.

Материал и метод. В опытах были использованы первичные культуры клеток куриных фибробластов, перевиваемые линии клеток Геля и др. Культуру выращивали в маленьких чашках Петри с применением среды «199» с добавлением 10% бычьей инактивированной сыворотки. Заражение проводилось лейптоноадными формами *L. tropica*, выращенными на двухфазной питательной среде. Перед заражением среду «199» сливали и на растущую ткань добавляли, предварительно отцентрифугированную, жидкую часть двухфазной среды и оставляли для контакта лейptomonад с клетками ткани на 1,5—2 часа при комнатной температуре. Затем вновь добавляли питательную среду «199» и чашки помещали в термостат при 37°C.

Фиксацию проводили через 12—24—48 и 72 час. после заражения 1% забуференным раствором $O_2 O_4$ в течение 30 мин., а также 2% раствором глютаральдегида на фосфатном буфере—5 мин., с дофиксацией 1% $O_2 O_4$ в течение 30 мин. Ткань обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в смесь метакрилатов с добавлением перекиси бензоила в качестве катализатора. Для заключения в метакрилат использовали металлические кольца. Срезы получены на ультратоме LKB-Producter, окрашивали 5% водным раствором уранилацетата, а также лимоннокислым свинцом. Электронные фотографии получены на микроскопе JEM-6C при 80 kw.

Параллельно с помощью светового микроскопа проводилось исследование зараженной культуры ткани в окрашенных препаратах.

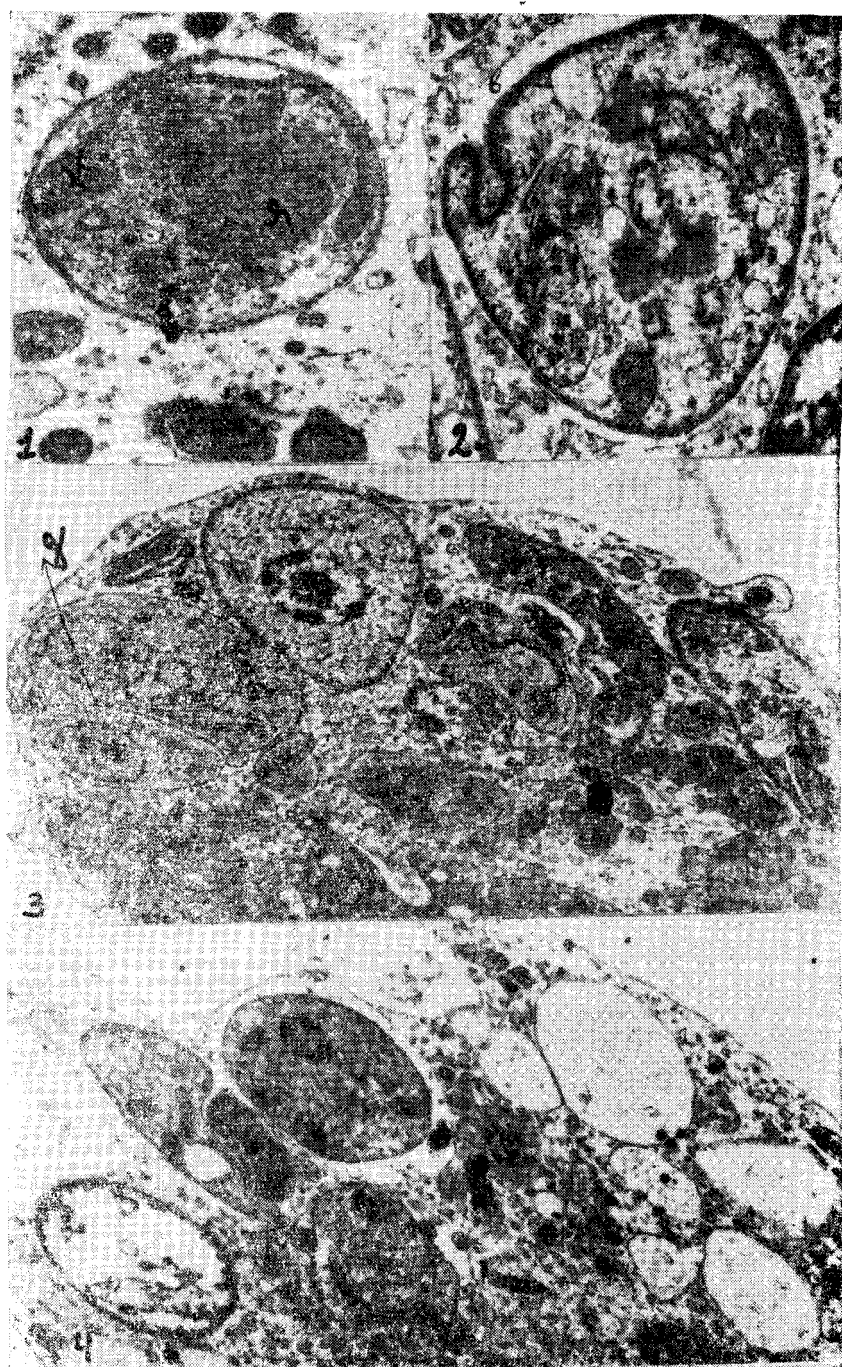


Рис. 1—2. 24 часа после заражения. $\times 27.000$. $0,5\mu = 13,5$ мм. Рис. 3. 48 часов после заражения. $\times 12.000$ $1\mu = 12$ мм. Рис. 4. 72 часа после заражения. $\times 10.000$ $1\mu = 10$ мм. Условные обозначения: я — ядро, к — кинетопласт, в — вакуоль, д — продольное деление лейшманий.

Результаты и обсуждение. Исследование проводили в динамике инфекционного процесса.

Через 12 час. после заражения все паразиты имели лептомонадную форму и находились вне клеток в культуральной жидкости. В клетках культуры ткани заметных изменений не обнаружено.

Через 24 час. отмечается массовое проникновение лептомонад в клетки, при этом в клетках паразиты округляются и, теряя жгут, переходят в лейшманиальную форму. Отдельные лейшмании в клетках фибробластов кур (ФЭК) заключены в вакуоль. Число пораженных клеток невелико (рис. 1—2).

Через 48—72 час. число пораженных клеток увеличено. Клетки культуры подвержены частичному разрушению. Ядро клетки оттесняется к периферии и деформируется. В цитоплазме имеется много больших и малых вакуолей. В больших вакуолях содержатся остатки погибших лейшманий. Монослой клеток нарушается и клетки фибробластов лежат группами в одиночку. В цитоплазме лейшманий нередко лежат беспорядочно, по 8—10 особей в каждой клетке. Встречаются делящиеся формы лейшманий, заключенные в вакуоль. В среде почти не встречается лептомонадных форм. Крайне редко отмечается выход лейшманиальных форм в культуральную жидкость. Вышедшие из клеток паразиты часто дегенерированы (рис. 3—4).

Изучаемая нами система «лейшмания-клетка» является недостаточно благоприятной как для паразита, так и для клеток хозяина, ибо наряду с наличием в клетках делящихся форм лейшманий имеет место и дегенерация паразита. Однако в этой системе возможно хорошо изучить моменты инвазии и внутриклеточного расположения лептомонад, а также их переход в лейшманиальную форму. По данным наших наблюдений, лептомонады активно проникают в клетку с повреждением ее поверхностной оболочки. Цитопатические изменения в клетке обусловлены развитием и размножением внутриклеточных паразитов.

Ереванский государственный университет
и Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи АНМ СССР, г. Москва

Поступило 27.II 1967 г.

Ա. Ա. ԱՎԱԿՅԱՆ, Ի. Ա. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ

Л. TROPICA-ի ՆԵՐՔԶԶԱՅԻՆ ՍՏԱԴԻԱՅԻ ԷԼԵԿՏՐՈՆՄԻԿՐՈՍԿՈՊԻԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

L. tropica-ի էլեկտրոնմիկրոսկոպիական ուսումնասիրության համար օգտագործվել են հավի ֆիբրոբլաստների առաջնային կուլտուրան և Hela-բջջերը: Բջջիների վարակումը կատարվել է L. tropica-ի լեպտոմոնադ ձևերով: Ուսումնասիրությունը կատարվել է վարակման պրոպեքի տարբեր էտապներում:

վարակումից 24 ժամ հետո նկատվում է, որ լեպտոմոնադները թափանցում են բջիջների մեջ, կորցնելով իրենց մտրակը, փոփոխվում են լեյշմանիալ ձևերի և կիսվելով բազմանում են:

48—72 ժամ հետո վարակված ու ձևափոխված բջիջների թիվն աճում է:

Բջջի վրա լեյշմանիայի ցիտոպաթոզեն ազդեցությունը պայմանավորված է ներբջջային ձևերի զարգացման ու բազմացման երևույթով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Белова Е. М. Зоологический журнал, т. 43, вып. 12, 1961—62, 1964.
2. Дегтярева С. М., Засухин Д. Н. Медицинская паразитология и паразитарные болезни, т. 28, 6, 706—709, 1959.
3. Belle E. A. Canad. Med. Association J., v. 79, 9, 726—728, 1958.
4. Gavrilov W. et Laurencin S. Ann. Soc. Belge Medicine Tropicale, v. 18, 1, 41—56, 1933.
5. Hawking F. Traus Roy. Soc. of Trop. Med. and Hygiene, v. 41, 4, 545—554, 1948.
6. Lelijveld Z. et Atanasiu P. Ann. Inst. Pasteur, v. 110, 5, 788—791, 1966.
7. Lupasco Gh. et al. Arch. Roum de Pathologie experimentale et de microbiologie, v. 22, 1, 167—171, 1963.