

## КЛЕТКА В КЛЕТКЕ, ИЛИ «БОМБА» ЗАМЕДЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

Т.В. Бейер

*Тамара Владимировна Бейер, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН. Руководитель проекта 95-04-11068.*

Когда в новой компании меня спрашивают, чем я занимаюсь, отвечаю, что я биолог-цитолог, а к упоминанию о паразитах стараюсь подходить постепенно и несколько издалека. И это понят но — в современный лексикон слово «паразит» вошло с весьма негативным смыслом. И все же я рада, что всю свою жизнь в науке посвятила всестороннему изучению паразитов, от гельминтов (в студенческие годы в Ленинградском университете) до простейших (в Институте цитологии РАН), поскольку, раскрывая тайны этих существ и удивляясь их умению контактировать с заключающей их клеткой или тканью, я постигала одно временно и секреты общения между людьми в коллективе.

Паразитизм — широко распространенное биологическое явление, с которым все без исключения живые существа, так или иначе, сталкиваются в ходе эволюции. Паразитарные инфекции вызывают не только экзотические для нас, северян, болезни. Возбудители многих из них существуют бок о бок с нами, и каждый может ими заразиться в любой момент, часто даже и, не заметив этого. В первую очередь это относится к наиболее специализированным внутриклеточным паразитам: вирусам, бактериям, грибам, простейшим и даже гельминтам. Наша небольшая научная группа уже много лет занимается изучением паразитических простейших — кокцидий (*Coccidiida*) — ближайших родственников малярийных паразитов рода *Plasmodium*.

Как известно, при паразитизме один организм (хозяин) служит средой обитания для другого (паразита). Обитание внутри клетки ставит паразита в строгую экологическую и метаболическую зависимость от хозяина, хотя от такого союза в первую очередь страдает хозяин. В результате создается система паразита и хозяина, в которой вследствие отбора устанавливается более или менее устойчивое равновесие между партнерами. Однако человеку в качестве хозяина в этом отношении повезло меньше, чем животным. Как справедливо отмечает С.А. Беэр [1], человек, ввиду своей относительной эволюционной молодости, не успел еще образовать ни с одним из паразитических организмов равновесной системы, и все паразиты для него оказываются патогенными, хотя и в разной степени.

К сожалению, человеку очень не повезло еще раз, и это стало особенно очевидным в последние десятилетия XX в., с приходом на планету вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и связанного с ним страшного недуга — синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). Сегодня ВИЧ-инфекция по-прежнему считается абсолютно смертельной. Но было замечено, что больные умирают от СПИДа по-разному, т.е. от разных вторичных инфекций. Оказалось, что снижение иммунной защиты макроорганизма стимулирует реактивацию многих патогенных организмов, которые раньше, до наступления иммунодефицита, находились в организме человека в скрытом состоянии и внешне никак себя не проявляли. Такие инфекции называются условно-патогенными, или оппортунистическими (от англ. opportunity — возможность), и во многих случаях вызываются внутриклеточными паразитами. Справедливо отмечено, что до тех пор, пока не будет побежден вирус иммунодефицита человека, надежда на продление жизни больных со СПИДом будет зависеть в первую очередь от успехов медицины в борьбе с оппортунистическими болезнями [2]. Вот и пришло время вирусологам, бактериологам и протозоологам объединить усилия в борьбе со СПИДом.

Более трех четвертей всех летальных исходов при СПИДе происходит по вине оппортунистических инфекций, некоторые из них квалифицируются даже как СПИД-

маркерные болезни. Наибольшее значение среди возбудителей этих инфекций принадлежит протисту аскомицетному грибу *Pneumocystis carinii*, вызывающему интерстициальную пневмонию со значительным числом летальных исходов. По сравнению с вирусными и бактериальными возбудителями паразитические простейшие в этом отношении изучены еще крайне мало.

Так что же такое оппортунистические инфекции? По общепринятому определению, это — инфекции, вызываемые условно-патогенными микробами, заражение которыми у здорового (иммунокомпетентного) субъекта не сопровождается патологическими явлениями, а при угнетении иммунной системы вызывает заболевания [3]. Такую характеристику вряд ли можно назвать исчерпывающей, поскольку в ней не разъясняется специфика оппортунистического патогена. Еще в 1937 г. А.А. Филиппченко [4] заметил, что нельзя определять один объект (паразита) по признаку, исключительно принадлежащему другому объекту (хозяину). В нашем же случае иммунодефицит проявляется как раз у хозяина, а не у паразита.

Этот постулат во многом стимулировал наш интерес к биологической сущности оппортунистических патогенов, а также к тем механизмам, с помощью которых одни из них могут воспользоваться иммунодефицитным состоянием хозяина, а другие — нет. Заметим, что поиск адекватного определения условно-патогенных и патогенных инфекций ведется уже давно и особенно активно медицинскими паразитологами [5, 6], с которыми мы расходимся в оценке категории «биологических свойств» возбудителей. Для наших медицинских коллег это — в первую очередь патогенность возбудителя, для нас — его жизненный цикл. Сравнив жизненные циклы кокцидий, мы были поражены тем, что из великого множества этих патогенов к категории оппортунистических (согласно определению) можно отнести лишь считанные единицы возбудителей — *Toxoplasma gondii*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora sp.*

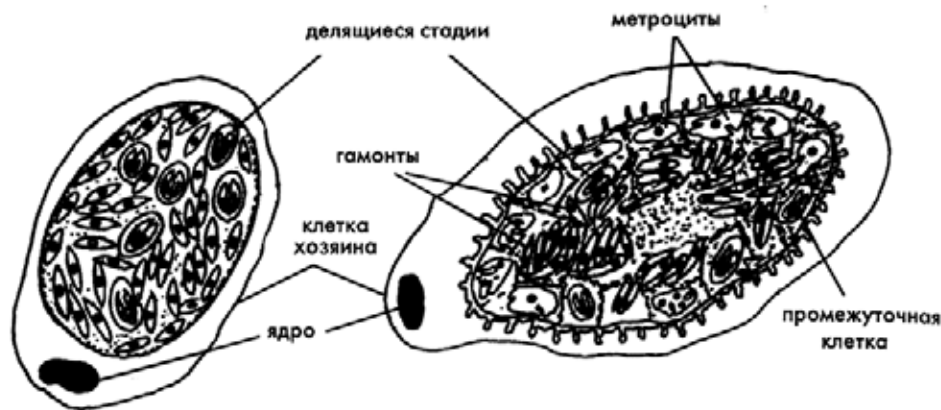


Рис. 1. Схематическое изображение тканевых цист *Toxoplasma gondii* (слева) и *Sarcocystis spp.*

Для разрешения всех вопросов нам нужны были как минимум две экспериментальные модели: оппортунистического и неоппортунистического патогенов. Однако нельзя было начинать работу, не имея собственной рабочей гипотезы. И в этом плане нам повезло, поскольку к началу исследований у коллектива был свой достаточно серьезный научный задел по изучению биологии кишечных кокцидий рода *Eimeria* (неоппортунистический патоген) и паразита органов и тканей позвоночных животных — токсоплазмы *T. gondii* (оппортунистический). Полная расшифровка циклов развития токсоплазмы, как, впрочем, и других цистообразующих кокцидий (*Sarcocystis*, *Frenkelia*), была сделана в начале 70х годов текущего столетия [7,8,9]. В частности, было показано, что их жизненные циклы включают двух хозяев — промежуточного (жертву) и окончательного (хищника). В те годы мне повезло поработать в Институте серологии в Копенгагене, где удалось получить

дополнительные данные в пользу кокцидийной природы *T.gondii*. Впоследствии результаты этих работ и более ранних исследований по видам рода *Eimeria* были обобщены в монографии [10].

Позднее, уже в 90-е годы, сопоставление данных по биологии разных родов эймериидных кокцидий позволило нам сформулировать основные постулаты рабочей гипотезы. В жизненном цикле оппортунистического патогена должны присутствовать персистирующие (покоящиеся) стадии, обладающие непременно бесполоыми (не половыми!) потенциями. Такие стадии заключены внутри защитных образований (цист), позволяющих ему выживать в организме хозяина с нормальной иммунной системой в течение длительного времени. Обычно это происходит в иммунологически привилегированных органах и тканях (головном мозге, мышцах), куда почти не проникают антитела. В условиях же иммунодефицита, когда в крови хозяина количество лимфоцитов Т4 снижается (до 200 в одном микролитре), только покоящиеся бесполое стадии паразита способны к бесконтрольному размножению в организме зараженного хозяина.

Важно понимать, что заражение хозяина и приобретение им иммунодефицита — два разных события, разделенных во времени и пространстве. Так, человек может быть инфицирован *T.gondii* в детстве, а приобрести иммунодефицит — в зрелые годы, и именно тогда произойдет реактивация тех тканевых цист, которые долгие годы благополучно сохранялись в головном мозге и других органах. Получается, что человек, однажды заразившийся оппортунистическим патогеном, фактически никогда с ним не расстается и всю свою жизнь как бы сидит на неразорвавшейся бомбе, роль которой играют латентные (скрытые) стадии такого патогена. Разрыв «бомбы» (реактивация спящего паразита) может произойти спустя многие годы, например при СПИДе, в результате чего у больного развивается обширный энцефалит, и мозговые нарушения обычно оказываются необратимыми.

Приступить к проверке нашей гипотезы мы смогли в 1995—1997 гг. На тот раз в качестве модели неоппортунистического патогена были взяты кокцидии рода *Sarcocystis*, которые подобно *T.gondii* также формируют цисты в промежуточном хозяине, но только не в мозге, а в мышечной ткани. В ходе сравнительного изучения ультраструктуры и метаболизма этих возбудите лей нам удалось выявить принципиальные различия в персистировании внутри цист *T.gondii* и *Sarcocystis* [11, 12]. Цисты токсоплазмы включают клетки только одного морфофункционального типа, тогда как цистные стадии саркоспоридий представлены, по крайней мере, тремя разными типами клеток (рис.1, 2). Но главное различие состоит не в количестве стадий, а в их качественном разнообразии.

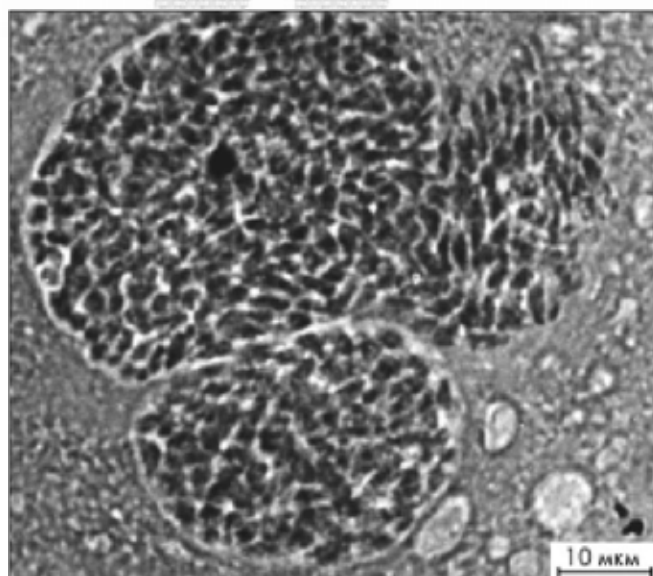


Рис.2. Цисты *Toxoplasma gondii* на срезе головного мозга мыши. Окраска на полисахариды.

Оценивая развитие изучаемых паразитов, мы пришли к заключению, что все цистные клетки *T. gondii* (брадизоиты) — бесполое медленно развивающиеся (пролиферирующие) стадии. В условиях иммунодефицита тканевые цисты нередко разрушаются, при этом происходит обратное развитие (кон версия) брадизоитов в предцистные быстро пролиферирующие клетки (тахизоиты). По существу это и есть реактивация латентной инфекции. С этого момента развитие паразита больше не сдерживается клеточным иммунитетом, а развивающиеся тахизоиты не испытывают губительного воздействия цитокинов ( $\gamma$ -интерферона или фактора некроза опухолей). Бурное бесконтрольное размножение паразитов приводит к обширному поражению головного мозга и органа зрения. В цистах *Sarcocystis* развитие паразита, напротив, идет необратимо и только в одном направлении: от бесполой, способной к пролиферации, мероциты и промежуточных клеток к высоко дифференцированным предполовым клеткам — гамонтам, утратившим способность к делению. Старые гамонты своевременно удаляются из популяции цист в результате естественной гибели клеток и тем самым исключаются из дальнейшего участия в половом процессе в окончательном хозяине. Этим можно объяснить наличие пустот в центре зрелых саркоцист (рис.1, *справа*), в которых гамонты составляют свыше 95% всех цистных клеток. В условиях иммунодефицита, даже в случае выхода из разрушенных саркоцист гамонты *Sarcocystis*, в отличие от цистных стадий *T. gondii*, не смогут приступить к размножению в том же хозяине.

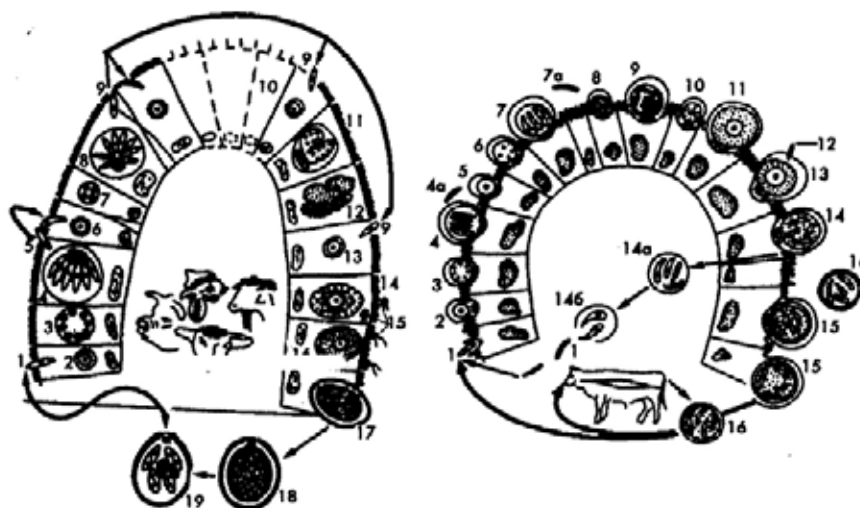


Рис.3. Схематическое изображение жизненных циклов кишечных кокцидий рода *Eimeria* (слева) и *Cryptosporidium*. Стрелками показано направление развития *Eimeria*: 1 — спорозоит; 2—4 — мерогония 1-й генерации; 5 — мерозоит 1-й генерации; 6—8 — мерогония 2-й генерации; 9 — мерогония n-й генерации; 10—12 — микрогаметоцитоз; 13, 14 — макрогаметоцитоз; 15 — микрогаметы; 16—18 — неспорулированные ооцисты; 19 — спорулированные ооцисты во внешней среде. *Cryptosporidium*: 1 — спорозоит; 2—4 — мерогония 1-й генерации; 4a — мерозоит 1-й генерации; 5—7 — мерогония 2-й генерации; 7a — мерозоит 2-й генерации; 8, 9 — микрогаметоцитоз; 10, 11 — макрогаметоцитоз; 12 — оплодотворение; 13 — образование зиготы; 14, 15 — спорулированные ооцисты внутри клетки; 14a, 14b — ооцисты, сохраняющиеся в организме хозяина; 16 — спорулированные ооцисты вне клетки и во внешней среде.

Главное различие в развитии токсоплазмы и саркоспоридий в фазе персистирования, по нашему мнению, позволяет понять и разницу в течение инфекционного процесса при токсоплазмозе и саркоцистозе в организме хозяина с ослабленным иммунитетом. Соотношение процессов пролиферации и дифференцировки в жизненных циклах патогенов и определяет способность токсоплазмы (или неспособность саркоспоридий) использовать в своем развитии возможность, предоставляемую иммунодефицитным состоянием хозяина.

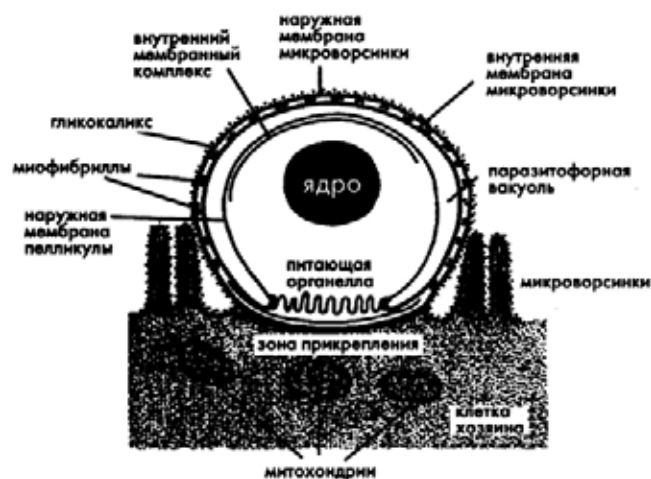


Рис.4. Схема экстрацитоплазматической локализации стадий развития *Cryptosporidium parvum* в энтероцитах кишечника мыши. (Braendler, 1982.)

В качестве модели оппортунистического патогена при кишечном паразитизме мы выбрали кокцидий рода *Cryptosporidium*, в жизненном цикле которых, в отличие от *T.gondii* и *Sarcocystis* и подобно кишечным кокцидиям рода *Eimeria* участвует только один хозяин (рис.3). Эти паразиты вызывают у больного изнурительную профузную диарею, которая сопровождается резким обезвоживанием организма и даже гибелью. От этой инфекции чаще всего погибают телята первых дней жизни, а для человека она опасна только при СПИДе.

Кроме того, поражает удивительная особенность *Cryptosporidium* — способность локализоваться в энтероцитах кишечника хозяина экстрацитоплазматически (рис.4), что затрудняет или даже исключает воздействие на паразита защитных механизмов клетки хозяина (лизосомального переваривания или окислительного взрыва). Со стороны просвета кишки паразит надежно защищен двумя мембранами паразитофорной вакуоли и тремя мембранами собственной пелликулы. Последнее обстоятельство отчасти объясняет исключительную устойчивость криптоспоридий к лекарствам (криптоспоридиоз не лечится!).

Перечисленные биологические особенности, конечно же, значительно отличают криптоспоридий от других кишечных кокцидий, но вряд ли объясняют оппортунистическую природу этого патогена, поскольку ни одна из них не ассоциируется с его возможным персистированием. И только благодаря более глубокому изучению полного жизненного цикла *C.parvum* у крипторидий удалось обнаружить стадию покоя, но особого рода. В отличие от большинства других кишечных кокцидий, ооцисты криптоспоридий полностью спорулируют и становятся инвазионными (способными заражать) не во внешней среде, а в организме хозяина. Часть ооцист не выделяется наружу, а остается в хозяине (рис.3, справа, стадии 14 и 14a), но неизвестно, в каких именно органах и тканях. Ясно одно — местом сохранения ооцист не могут быть энтероциты кишечника.

По данным электронно-микроскопических исследований Н.В. Свежовой, ооцисты *C. parvum* сохраняют структурную целостность даже внутри фагосом клеток иммунной системы зараженных крыс — макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов, нейтрофилов [13] (рис.5). Способность фагоцитов захватывать патоген в просвете кишечника продемонстрировала новую сторону отношений между паразитом и хозяином при криптоспоридиозе. Еще больший интерес представляет вызываемое этим паразитом формирование на апикальной поверхности макрофагов характерной экстрацитоплазматической паразитофорной вакуоли, внутри которой нормально развиваются эндогенные стадии (рис.6).

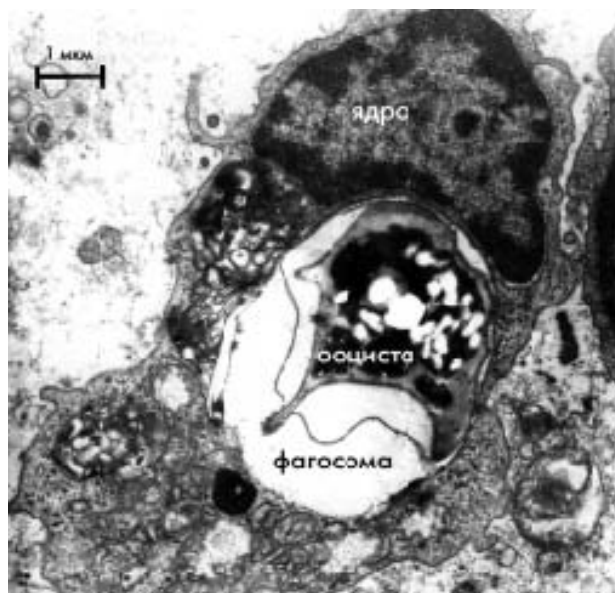


Рис.5. Ооциста *Cryptosporidium parvum* внутри фагосомы макрофага крысы. (Свежова Н.В., 1997.)

Хотя наши исследования находятся еще на начальном этапе, уже и сейчас с определенной долей уверенности можно говорить о возможности для тельного переживания (персистирувания) криптоспоридий в организме хозяина, что происходит благодаря их способности развиваться не только в кишечнике, но и вне кишечника — в макрофагах, а может быть и в других клетках иммунной системы макроорганизма. При иммунодефиците бесполое эндогенные стадии паразита высвобождаются из таких клеток и немедленно приступают к бесконтрольному размножению в кишечнике. Это во многом облегчается благодаря известной способности 1-й генерации мерозоитов *Cryptosporidium* к рециклированию, приводящему к многократному умножению числа бесполой стадии той же генерации (сходный механизм рециклирования известен еще только у *T. gondii* в кишечнике кошки). Тем самым объясняется обширная паразитарная колонизация криптоспоридиями кишечника и других органов у хозяина с ослабленным иммунитетом.

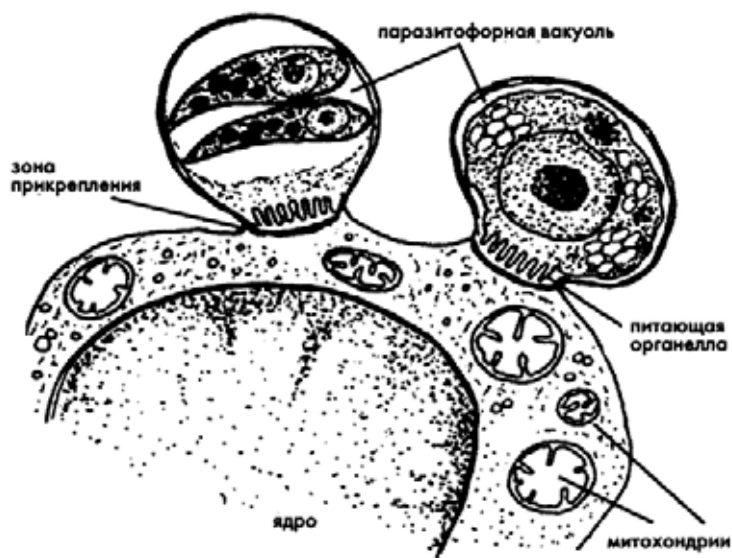


Рис.6. Схема экстрацитоплазматической локализации *Cryptosporidium parvum* в макрофаге крысы. (Свежова Н.В., 1997.)

Итак, при изучении внутриклеточных паразитов (кокцидий) нам удалось провести границу между оппортунистическими и неоппортунистическими патогенами на основании выявления различий в соотношении процессов пролиферации и дифференцировки в их жизненных циклах. Если стадии, способные к персистированию, сохраняют функции бесполой клетки, то при снятии иммунного надзора они смогут приступить к бесконтрольному размножению в хозяине, в результате чего начнется развитие инфекционного процесса. Если латентными стадиями оказываются дифференцированные клетки, то они не способны к дальнейшей пролиферации в том же хозяине даже при СПИДе.

Мы остановились лишь на двух оппортунистических протозойных патогенах — *T. gondii* и *S. parvum*. Ясно, что проблема таких патогенов и вызываемых ими болезней значительно шире. По мнению А.Я. Лысенко, эта проблема заслуживает включения в приоритетную федеральную научно-практическую программу, в которой должны участвовать специалисты разных профилей — паразитологи, цитологи, иммунологи, инфекционисты, патологи [6]. На фоне все более и более устрашающих сведений о размахе ВИЧ-инфицированности в нашей стране эти слова должны восприниматься не только как мудрое пожелание, но и как призыв к немедленному действию.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Бээр С.А. Паразитизм // Природа. 1996. №12. С.19—26.
- 2 Mills J., Mazur H. AIDS-related infection // Scientific American. 1990. V.263. №2. P.50—57.
- 3 Редфилд Р.Р., Берке Д.С. Клиническая картина инфекции вирусом СПИДа // В мире науки. 1988. №12. С.60—69.
- 4 Филиппченко А.А. Экологическая концепция паразитизма // Учен. зап. ЛГУ. Сер. биол. Т.4. С.4—14.
- 5 Фролов А.Ф., Зарицкий А.М., Фельдман Ю.М. Новые принципы и критерии оценки патогенных и условнопатогенных микроорганизмов // Журн. микробиол. 1986. №9. С.93—97.
- 6 Лысенко А.Я. Роль условно-патогенных простейших в патологии человека на современном этапе // Мед. паразитол. и паразит. болезни. 1994. №4. С.3—8.
- 7 Hutchison W.M., Dunachie J.F., Siim J.Chr., Work K. Life cycle of *Toxoplasma gondii* // Brit. Med. J. 1970. V.1. P.142—144.
- 8 Frenkel J.P., Dubey J.P., Miller N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts // Science. 1970. V.164. P.893—896.
- 9 Fayer R. Gametogony of *Sarcocystis* sp. in cell culture // Science. 1972. V.175. P.65—67.
- 10 Бейер Т.В., Шибалова Т.А., Костенко Л.А. Цитология кокцидий. Л.: Наука, 1978.
- 11 Beyer T.V., Radchenko A.I. Cytological investigation of cystforming coccidia of the genus *Sarcocystis* Lankester, 1882. I. The sarcocyst as a peculiar kind of meront comprising three different cell types whose successive development terminates in gamont formation // Protozool. Abstrs. 1995 V.19. №10. P.645—649.
- 12 Radchenko A.I., Beyer T.V. Cytological investigation of cystforming coccidia of the genus *Sarcocystis* Lankester, 1882. II. Involvement of cell organelles in the process of asexual reproduction within the sarcocyst // Protozool. Abstrs. 1995. V.19. №10. P.651—657.
- 13 Свежова Н.В. Взаимоотношения кокцидии *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa, Sporozoa) с клетками иммунной системы хозяина—млекопитающего // Паразитология. 1997. Т.31. №4. С.328—333.