

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭНДОЗОИТОВ *TOXOPLASMA GONDII*
С КЛЕТКАМИ САЛЬНИКА БЕЛОЙ МЫШИ
ПРИ ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНВАЗИИ.
ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

А. К. Шустров, В. Г. Селиверстова, Т. Н. Хавкин

Институт экспериментальной медицины АМН СССР

Прослежена реакция фагоцитирующих и не фагоцитирующих клеток сальника на паразитирование в них эндозоитов. Признаки функциональной активации этих клеток сменяются признаками угнетения и повреждения. Обнаружена способность эндозоитов токсоплазм вирулентного штамма RH лизировать мембрану паразитофорной вакуоли.

Открытие полного жизненного цикла *Toxoplasma gondii* и изучение всех стадий развития этого паразита показало, что разные формы существенно различаются по строению, метаболизму и по преимущественной локализации в организме хозяина (Засухин и др., 1973; Галузо, 1974; Бейер, 1977; Frenkel, 1973). Обнаруженные различия в биологических свойствах наводят на мысль о различиях в патогенном действии разных стадий *T. gondii* и указывают на необходимость специальных исследований каждой стадии токсоплазм с учетом вирулентности того или иного штамма. Данная работа посвящена анализу патогенных свойств эндозоитов токсоплазм, выявляющихся при взаимодействии паразита с клетками хозяина в наиболее ранние сроки экспериментальной инвазии.

Начальные этапы взаимодействия эндозоитов с клетками до настоящего времени изучали в основном в культурах тканей. На этой модели прослежены высокие инвазионные свойства эндозоитов (Aikawa e. a., 1977) и их способности тормозить слияние лизосом с фагосомами, содержащими паразитов (Jones, 1974; Хавкин, 1977). Эти свойства эндозоитов представляют собой важные факторы патогенности. В культуре ткани они делают возможным проникновение паразитов в клетки разного происхождения и существование в мононуклеарных фагоцитах. Однако дальнейшие этапы взаимодействия эндозоитов с клетками, реакция клеток на паразита и способ выхода паразитов из клетки в целостном организме хозяина до настоящего времени не изучены. Выяснение этих вопросов составляет задачу данной работы.

При заражении лабораторных животных эндозоитами вирулентных штаммов токсоплазм они прежде всего образуют паразитарные очаги в области инокуляции: в собственной и в подслизистой оболочках кишки — при энтеральном заражении (Pellerdy, Dobos-Kovacs, 1974; Ухов и др., 1978) в подкожной клетчатке и мышцах — при подкожном, в сетчатке глаза — при интраокулярном (Yoshizumi, 1976) и т. д. Область инокуляции — наиболее удобный объект для анализа наиболее ранних этапов взаимодействия паразита и хозяина, так как эндозоиты обнаруживаются здесь с первых часов после заражения преимущественно в мононуклеарных фагоцитах (макрофагах и гистиоцитах) и иногда в клетках паренхимы данного органа. Нами в качестве объекта исследования избран сальник бе-

лых мышей, зараженных токсоплазмами внутрибрюшинно. Наши предыдущие исследования (Шустров и др., 1968) показали, что сальник богат клетками, которые становятся местом обитания эндозоитов. Кроме того, в сальнике паразиты поселяются в клетках с различной специализацией — в гистиоцитах (моноклеарных фагоцитах) и в клетках мезотелия. Последние, хотя и участвуют в переносе жидкости посредством везикулярного транспорта, в норме к фагоцитозу не способны (Cotran, Karnovsky, 1968).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электронно-микроскопически изучен сальник 8 белых мышей, убитых через 24, 48, 72 и 96 ч после внутрибрюшинного заражения мышинным перитонеальным экссудатом, содержащим эндозоитов токсоплазм штамма, РН. Каждому животному вводили по 4×10^6 паразитов в 0.1 мл экссудата, разведенного в 10 раз. Кроме того, исследован сальник двух незараженных мышей. Сальник фиксировали 1 ч *in situ*, вводя внутрибрюшинно 2%-й раствор глутаральдегида, после чего его иссекали, дополнительно фиксировали 1% OsO_4 и заливали в аралдит. Контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе УЭМВ-100Л. Параллельно проводили гистологическое исследование сальника зараженных мышей так, как описано ранее (Шустров и др., 1968) и в те же сроки, что и электронную микроскопию.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гистологическое исследование показало, что инфекционный процесс в брюшине развивался так же, как в наших опытах, проведенных ранее (Шустров и др., 1968). Эндозоиты размножались в гистиоцитах млечных пятен и дырчатой части сальника и в его мезотелиальных клетках. Инфицированные клетки некоторое время сохраняли жизнеспособность, некоторые даже делились митозом. Массовый распад пораженных клеток начался примерно на 2—3-и сутки после заражения. Он сопровождался образованием фибринозной вышота на поверхности сальника, инфльтрацией его полинуклеарами и макрофагами. Животные погибали на 4—5-е сутки после заражения.

При электронно-микроскопическом исследовании выявилось, что сальник незараженных мышей представляет собой соединительнотканую пластинку, в которой среди пучков коллагена рыхло рассеяны клетки типа фибробластов и гистиоцитов. Для тех и других характерно наличие удлиненных ветвящихся отростков. В области млечных пятен сальника соединительнотканая пластинка была несколько утолщена. Здесь между фибробластами и гистиоцитами имелись скопления макрофагов неправильной округлой формы. Обе поверхности соединительнотканой пластинки покрывал слой мезотелиальных клеток. У зараженных животных сальник сохранял свою структуру. Только к концу наблюдений на его поверхности обнаруживались глыбки фибрина, обломки клеток, а также макрофаги и полиморфоядерные лейкоциты, частично разрушенные, частично содержащие фагоцитированные обломки клеток и деформированные пикнотичные остатки эндозоитов токсоплазм. В отличие от других органов, где происходит массовое размножение токсоплазм, в сальнике не возникало очаговых некрозов.

Токсоплазмы обнаруживались в сальнике в клетках мезотелия, в гистиоцитах и в макрофагах млечных пятен. В сроки 24—48 ч после заражения эндозоиты чаще всего находились в тесных или в просторных, но сравнительно небольших (рис. 1) паразитофорных вакуолях, практически не отличимых от обычных фагосом. Стенка таких вакуолей, образованная одной мембранной единицей, была гладкой. В эти же сроки, но чаще через 48—72 ч, встречались клетки с более сложной организацией стенки паразитофорных вакуолей. Их мембрана образовывала многочисленные микроворсинки, обращенные в просвет вакуоли. Микроворсинки имели такое же

строение, как в инфицированных клетках тканевых культур, о чем можно судить по снимкам, опубликованным во многих работах последних лет (Sheffield, Melton, 1968; Jones, 1974, и др.). Однако в клетках, растущих *in vitro*, не отмечено какой-либо ориентировки микроворсинок. Между тем в клетках сальника с небольшими вакуолями, содержащими одиночных паразитов, было видно, что наиболее густые разрастания микроворсинок соответствуют локализации переднего конца эндозоитов, находящихся в вакуоле (рис. 2). Как и в клетках *in vitro*, к мембране относительно небольших паразитофорных вакуолей снаружи примыкали цистерны гладкой сети, придавая стенке вакуолей многослойный вид. Однако контакт митохондрий со стенкой вакуолей наблюдался не так часто, как в клетках, растущих в культуре.

Паразитофорные вакуоли описанного вида содержали эндозоиты с четко выраженной структурой, с крупными пузырчатými митохондриями. Наблюдались картины деления паразитов посредством эндодиогении (рис. 2). Наряду с этим в гистиоцитах встречались вакуоли с одиночными отмирающими эндозоитами повышенной плотности для электронов, с пикнотичным ядром, слабо различной структурой цитоплазмы и органоидов. Стенка вакуолей с отмирающими токсоплазмами образовывала складки, но была лишена микроворсинок. Наблюдались картины слияния лизосом с такими вакуолями.

В сроки 24—48 ч у клеток сальника обнаруживались признаки повышенной метаболической и функциональной активности. Наиболее заметно они были выражены у инфицированных клеток. Отмечалось обилие рибосом и полирибосом, развитые митохондрии, комплексы Гольджи и эндоплазматическая сеть. Выявились и черты различия между клетками разной природы в их реакции на паразитов. В гистиоцитах и макрофагах млечных пятен было увеличено количество лизосом, встречались фагосомы с пикнотичными нежизнеспособными эндозоитами или с их остатками, слоистые и мультивезикулярные тела. В клетках мезотелия нежизнеспособные эндозоиты не встречались. В мезотелии, кроме отмеченных выше признаков повышенной метаболической активности, отмечалось обилие эндоцитарных пузырьков у апикальной и базальной поверхностей клеток, а также большое число микроворсинок. Это указывало на усиление транспортной функции мезотелия. В одном из препаратов обнаружена также глубокая инвагинация апикальной плазмалеммы в участке прикрепления к ней паразита. В разных местах сальника мезотелиальные клетки разъединены, обнажая подлежащие гистиоциты. Наблюдались картины выселения макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов на поверхность сальника через просветы в слое мезотелия, фагоцитоз лейкоцитами нежизнеспособных токсоплазм.

В макрофагах и в мезотелиальных клетках с крупными паразитарными колониями или с большим числом мелких объем цитоплазмы был заметно уменьшен. Отмечались признаки пониженной метаболической активности в виде уменьшения числа органоидов и просветления матрикса цитоплазмы. Отсутствовал контакт эндоплазматической сети со стенкой паразитофорной вакуоли. Вместе с тем ядра таких клеток не были изменены, и признаки остаточной специфической функциональной активности сохранялись даже при резко выраженной редукции органоидов. Из рис. 3, *a* видно, что в мезотелиальной клетке с узкой каймой сохранившейся цитоплазмы имеются многочисленные эндоцитарные пузырьки, указывающие на то, что транспортная функция мезотелия еще не угасла.

В сроки 72—96 ч отмечалось дальнейшее разрастание микроворсинок на стенках паразитофорных вакуолей. В наиболее крупных вакуолях в мезотелиальных клетках впервые были обнаружены микроворсинки такого строения, какое не встречалось в зараженных клетках иного происхождения, в том числе и в других органах. Эти микроворсинки образовывали колбовидные утолщения дистального конца, содержащие по 3—5, реже по 10—15 пузырьков вида пиноцитарных (рис. 3, *b*). Наблюдались картины слияния соседних паразитофорных вакуолей внутри одной клетки, а также

картины лизиса ограничивающей мембраны вакуолей с большим числом эндозоитов. В участках лизиса мембраны матрикс и органоиды цитоплазмы проникали в паразитофорную вакуоль и располагались между микроворсинками и эндозоитами. Заключительным этапом взаимодействия паразитов с клеткой было разрушение ее плазмалеммы и выход эндозоитов наружу.

ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие эндозоитов *T. gondii* с клетками сальника, гистиоцитами и мезотелием в целостном организме протекает в общих чертах так же, как в культуре ткани, с образованием паразитофорной вакуоли, но без обязательного скопления вокруг нее митохондрий. Тесный контакт эндоплазматической сети с паразитофорной вакуолью указывает на то, что и в целостном организме рост вакуоли происходит скорее всего путем включения в ее стенку цистерн гладкой и шероховатой сети (Sheffield, Melton, 1968; Müller, Scholtyseck, 1974). Отличительной особенностью взаимодействия эндозоитов с клетками сальника является более густое разрастание микроворсинок паразитофорной вакуоли, чем в клетках, растущих *in vitro*, и преимущественная локализация микроворсинок в тех участках мембраны, которые обращены к передним концам эндозоитов. Кроме того, в паразитофорных вакуолях в мезотелиальных клетках обнаружены не встречавшиеся ранее микроворсинки с колбовидными утолщениями. Наличие в этих утолщениях пиноцитарных пузырьков согласуется с представлением, что микроворсинки в паразитофорной вакуоли представляют собой приспособление, обеспечивающее лучший обмен веществ между паразитом и клеткой-хозяином (Müller, Scholtyseck, 1974). Стимулом образования микроворсинок служат сами эндозоиты. В пользу этого говорят: а) уже упоминавшаяся локализация наиболее густых разрастаний микроворсинок на стороне, обращенной к коноиду паразита, б) продолжающийся рост микроворсинок по мере размножения паразитов, в) отсутствие микроворсинок в вакуолях с нежизнеспособными эндозоитами. Поскольку паразитофорная вакуоль представляет собой псевдоцисту, стенка которой образована клеткой-хозяином, то разрастания микроворсинок следует рассматривать как пример ответной реакции хозяина, полезной для паразита.

Изучение сальника в разные сроки после заражения животных показало, что взаимодействие эндозоитов с клетками распадается на три этапа.

На первом клетка-хозяин сохраняет обычное строение и обнаруживает признаки усиления своей функциональной активности: несмотря на наличие в клетках паразитов, гистиоциты и мезотелиальные клетки сальника участвуют в воспалительной реакции, развивающейся в брюшине после заражения животных. Гистиоциты участвуют в фагоцитозе отмирающих паразитов и обломков клеток воспалительного экссудата, мезотелий — в транспорте жидкости, поступающей в брюшную полость в процессе формирования экссудата.

Следующим этапом взаимодействия клетка—паразит является подавление метаболической активности инфицированных клеток. Оно обусловлено размножением паразитов, ростом и слиянием паразитофорных вакуолей, ведущими к редукции органоидов цитоплазмы. Однако признаки специфической функции таких клеток сохраняются и при значительно выраженной редукции их цитоплазмы. Последний этап взаимодействия связан с лизисом мембраны паразитофорной вакуоли. В результате паразиты проникают в гиалоплазму пораженной клетки, которая вслед за этим погибает.

Способность вызывать лизис мембраны паразитофорной вакуоли на определенном этапе взаимодействия с клеткой следует рассматривать как фактор патогенности эндозоитов, обеспечивающий их выход из инфицированной клетки. Для внутриклеточных паразитов механизм выхода из клетки представляет собой столь же важное приспособление, как и меха-

низм внедрения в клетку, обеспечивающий сохранение данного организма в природе как вида (Moulder, 1974). Подобные разрывы ограничивающей мембраны известны при листериозной инфекции. Их связывают с действием гемолизинов листерий, содержащих лецитиназу (Armstrong, Sward, 1966). Предполагают, что при хламидиальных инфекциях разрыв ограничивающей мембраны вокруг хламидиальных колоний обусловлен действием протеолитических веществ возбудителя (Moulder, 1974). Известно, что эндозои токсоплазм также выделяют вещества с протеолитическим действием (Луске е. а., 1975). Можно полагать, что эти вещества, накопившись в паразитофорной вакуоли, и вызывают лизис ее мембраны. Это облегчает переход эндозоитов из клеток, исчерпавших свои энергетические ресурсы, в новые клетки.

Исследование показало, что в целостном организме пораженные эндозои клетки сальника сохраняют свойственные им черты тканевого типа, закрепившиеся в процессе эволюции. Наиболее наглядно это видно на примере мезотелия. Последний сохраняет характер слоя сильно уплощенных клеток и не уподобляется фибробластам или гистиоцитам-макрофагам. В отличие от гистиоцитов, которые после проникновения в них эндозоитов активно фагоцитируют обломки клеток и нежизнеспособных паразитов, мезотелиальные клетки содержат только живых эндозоитов, которые в них размножаются и стимулируют формирование микроворсинок. Это говорит о неспособности мезотелия к фагоцитозу и согласуется с представлениями Хлопина (1946), согласно которым мезотелий брюшины представляет собой высокоспециализированные клетки, не превращающиеся в клетки иного тканевого типа. Можно полагать, что эндозои проникают в мезотелиальные клетки не путем активного фагоцитоза, а прикрепившись к плазмалемме мезотелиальных клеток, и стимулируют такое перемещение их клеточной мембраны, которое обеспечивает погружение паразита в клетку и его изоляцию в паразитофорной вакуоле. Именно такой механизм внедрения, лишь внешне сходный с фагоцитозом, приписывают в настоящее время и токсоплазмам (Aikawa e. a., 1977) и другим микроорганизмам, способным к внутриклеточному паразитированию (Silverstein, 1977). Наши собственные наблюдения подкрепляют эту точку зрения.

Таким образом, эндозои вирулентного штамма токсоплазм в целостном организме животного обнаруживают способность внедряться в клетки, не только активно фагоцитирующие, но и не способные к фагоцитозу. Они стимулируют усиление метаболизма и образование специальных структур клетки-хозяина, облегчающих внутриклеточное паразитирование эндозоитов, и вызывают умеренное повреждение клетки, не нарушающее жизнедеятельности паразита. На конечном этапе взаимодействия с клеткой эндозои вызывают лизис мембраны паразитофорной вакуоли, облегчая себе тем самым переход в новые клетки. Перечисленные свойства эндозоитов можно рассматривать как факторы их патогенности, определяющие возникновение инфекции и ее генерализацию.

Л и т е р а т у р а

- Бейер Т. В. 1977. Токсоплазмиды, их жизненные циклы и положение в системе. — Паразитология, 11 : 382—393.
- Галузо И. Д. (ред.). 1974. Жизненный цикл токсоплазм. Алма-Ата : 1—280.
- Засухин Д. Н., Акиншина Г. Т., Калякин В. Н., Савина М. А., Грачева Л. И. 1973. Новое в изучении токсоплазм и близких организмов. — В кн.: Зоопаразитология, ВИНТИ, 3 : 7—62.
- Ухов Ю. И., Федичкина Г. П., Шевкунова Е. А. 1978. Патоморфология экспериментального токсоплазмоза, вызванного заражением per os белых мышей и морских свинок цистами и ооцистами *T. gondii*. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1 : 110—117.
- Хавкин Т. Н., Фрейдлин И. С. 1977. A fluorescence fase contrast study of the interaction between *Toxoplasma gondii* and lysosomes in living cells. — Z. Parasitenk., 52 : 19—21.
- Хлопин Н. Г. 1946. Общепаразитологические и экспериментальные основы гистологии. М. 1—492.

- Шустров А. К., Хавкин Т. Н., Святухина О. А. 1968. Развитие *T. gondii* и связанные с этим реактивные процессы в брюшине белых мышей. — *Паразитология*, 1 : 83—90.
- Aikawa M., Komata Y., Asai T., Midorikawa O. 1977. Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *T. gondii*. — *Amer. J. Pathol.*, 87 : 285—296.
- Armstrong V. A., Sward C. P. 1966. Electron microscopy of *List. monocytogenes* infected mouse spleen. — *J. Bact.*, 91 : 1346—1355.
- Cotran R. S., Karnovsky M. J. 1968. Ultrastructural studies on the permeability of the mesothelium to horseradish peroxidase. — *J. cell biol.*, 37 : 123—137.
- Frenkel J. K. 1973. *Toxoplasma* in and around us. — *Bio Science*, 6 : 543—552.
- Jones T. C. 1974. Macrophages and intracellular parasitism. — *J. Reticuloend. Soc.*, 15 : 439—450.
- Lycke E., Carlberg K., Norrby R. 1975. Interaction between *T. gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *toxoplasma*. — *Infect. Immun.*, 11 : 853—861.
- Meulder J. W. 1974. Intracellular parasitism. — *J. inf. dis.*, 130 : 300—306.
- Müller B., Scholtysek E. 1974. Research in Coccidia and other Apicomplexa. A progress report. — *Acta vet. Acad. sci. Hung.*, 24 : 221—233.
- Pellérdy L., Dobos-Kovács M. 1974. Studies on the pathogenicity of *toxoplasma* for mice. — *Acta vet. Acad. Sci. Hung.*, 24 : 313—326.
- Sheffield H. G., Melton M. L. 1968. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. — *J. Parasitol.*, 54 : 209—226.
- Silverstein S. C. 1977. Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and the penetration of obligate intracellular parasites. — *Amer. J. trop. med. hyg.*, 26 : 161—169.
- Yoshizumi M. O. 1976. Experimental *toxoplasma* retinitis. — *Arch. pathol.*, 100 : 487—490.

INTERACTION BETWEEN ENDOZOITES OF *TOXOPLASMA GONDII* AND CELLS OF THE OMENTUM OF WHITE MOUSE AT THE ACUTE EXPERIMENTAL INFECTION. ELECTRON MICROSCOPIC STUDY

A. K. Shustrov, V. G. Seliverstova, T. N. Khavkin

S U M M A R Y

The omentum of 8 white mice was examined 24—96 hours after the intraperitoneal infection. Endozoites are capable of intensive intrusion not only into phagocytizing cells (hystocytes, peritoneal macrophages) but also into the cells which are not phagocytes (mesothelium). Just after the intrusion metabolism of the host-cell intensifies and in it are formed special structures which facilitate metabolic processes between the cell and the parasite (microvilli on the membrane of the parasitophore vacuole). At the final stage of the interaction with the cell endozoites cause the lysis of the membrane of the parasitophore vacuole that facilitates their transition into new cells. The ability to intrude into the cells, which are not phagocytes, and to cause the lysis of parasitophore vacuole is a factor of pathogenicity of virulent strains of *toxoplasms* which determines the generalized character of the infection caused by them.

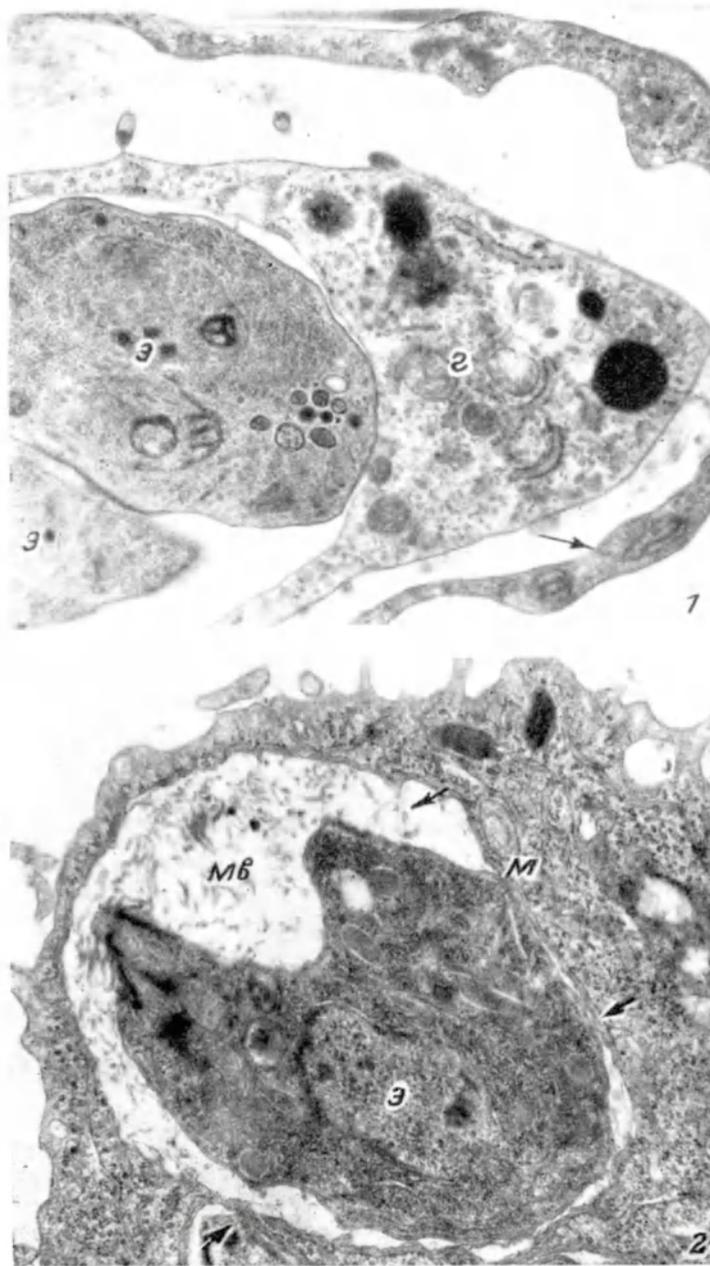


Рис. 1—2.

1 — эндозоиты *T. gondii* (Э) в гистиоците (Г) салыника. Большое число рибосом, крупные лизосомы и развитая шероховатая сеть гистиоцита указывают на его активацию. Мезотелиальные клетки (стрелки) не изменены. 48 ч после заражения, увел. 5000; 2 — делящийся эндозоит (Э) в мезотелиальной клетке. Мембрана паразитофорной вакуоли образует микроворсинки (МВ) на стороне, обращенной к передним концам дочерних особей паразита. К паразитофорной вакуоле примыкают митохондрия (М) и цистерны эндоплазматической сети клетки-хозяина (стрелки). 72 ч, увел. 8000.

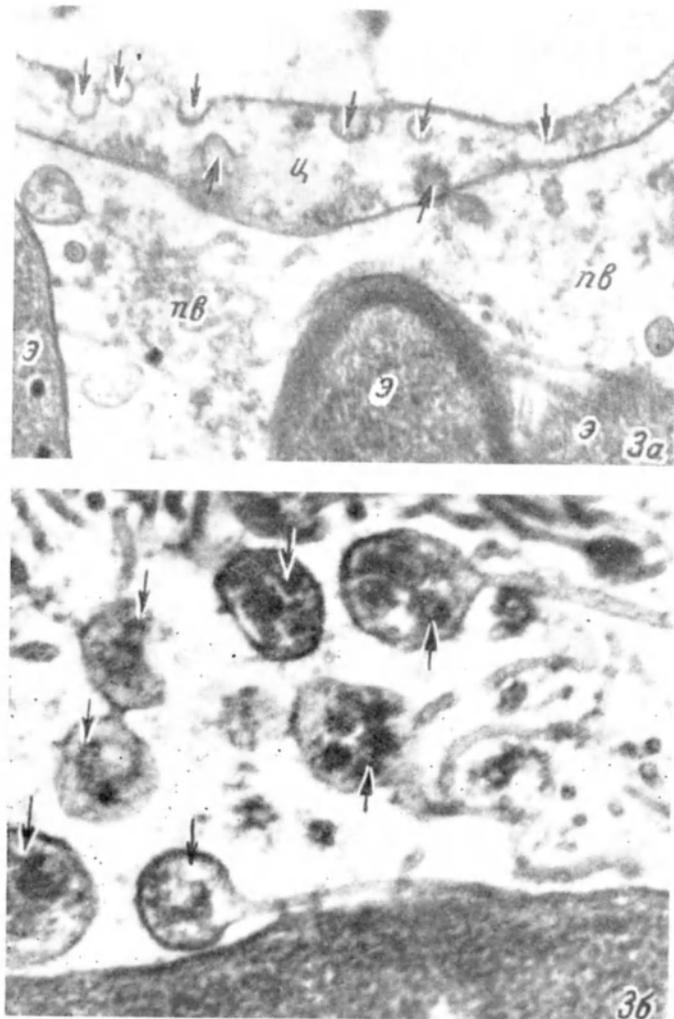


Рис. 3а, б

3 — часть мезотеллальной клетки с крупной паразитофорной вакуолью (PB), заполненной эндозитами (Э), 96 ч после заражения:

а — формирование пиноцитарных пузырьков в сохранившейся цитоплазме клетки-хозяина (П) — признак остаточной функциональной активности этой клетки; увел. 10 000; б — микроворсинки в просвете паразитофорной вакуоли образуют колбовидные утолщения (стрелки), содержащие пиноцитарные пузырьки. увел. 20 000.