О.В. Грицюк, З.Е. Федец., К.А. Новожилов, И.А. Абрамов
O.V. Gritsyuk, Z.E. Fedets, K.A. Novozhilov, I.A. Abramov

АНАЛИЗ ДАННЫХ О ПРОЦЕССЕ РАЗМНОЖЕНИЯ BLASTOCYSTIS SPECIES REPRODUCTION PROCESS ANALYSIS OF BLASTOCYSTIS SPECIES

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Жизненный цикл *Blastocystis* spp. – широко распространённого протозойного организма окончательно не расшифрован и остается дискуссионным. В настоящее время существует много схем, основанных на разных типах размножения, таких как, почкование, плазмотомия, эндодиогения, шизогония, множественное деление в тонко и толстостенных цистах, образование потомства в мешкоподобных вакуолях и возможной роли репродуктивных гранул центральной вакуоли бластоцист.

Ключевые слова: бластоцисты, жизненный цикл, бинарное деление, плазмотомия, почкование, эндодиогения, шизогония, цистная форма

The life cycle of *Blastocystis* - one of the most common human parasites in the world and is not yet conclusively demonstrated. Many hypotheses for reproduction mode of *Blastocystis* have been put forward, though little supportive evidence exists. The current only accepted mode of reproduction for *Blastocystis* is binary fission. The additional reproductive modes of *Blastocystis* have also been reported. These are plasmotomy, budding, schizogony, endodyogeny, multiple division in thin-and thick-walled cysts, sac-like pouches (indicating the production of progeny) and the possible role of reproductive granules of the central vacuole.

Key words: *Blastocystis* spp., life cycle, binary fission, plasmotomy, endodyogeny, schizogony, cyst form, sac-like pouch

Blastocystis – облигатный анаэробный одноклеточный организм, паразитирующий в толстом отделе кишечника человека и многих животных [1, 2, 3].

На основании анализа полной последовательности гена, кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК (SSU) пересмотрены ранее известные варианты таксономии паразита, и *Blastocystis* помещены в систему Protista, тип Stramenopila (Heterokonta), включающих эукариот с гетеротрофными и фотосинтетическими свойствами. Бластоцисты – нетипичные представители этой группы, так как являются единственно известными на сегодняшний день страменопилами, паразитирующими в организме человека и млекопитающих, а так же из-за анаэробной природы и отсутствия жгутиков и поверхностных труб-

чатых волосков. Их поместили во вновь созданный класс Blastocystea, подрод Opalinata, подцарство Chromobiota [4, 5]. Найти морфологическое сходство между *Blastocystis* и другими членами Stramenopiles довольно сложно. Однако, описание плазмотомии у бластоцист, характерной для большинства Stramenopiles, включая *Protoopalina intestinalis*, возможно, указывает на их филогенетическое сходство [6]

Согласно данным литературы, клетки бластоцист обладают свойством полиморфизма и вариабельностью основных (вакуолярной, гранулярной, амебоидной, цистной) и переходных стадий (мультивакуолярные, кластерные и формы, похожие на виноградные грозди). Имеют круглую, овальную, реже амебоидную форму. Существенно варьируют по размеру, строению оболочек, содержимому (структуре)

цитоплазмы, числу и размеру ядер, включений, хроматоидных телец и гликогена.

Важно отметить, что при описании форм, выделенных от разных хозяев, установлена морфологическая гетерогенность изолятов [7, 8]. Эти вариации, имея существенные отклонения от общепринятых, вызывали предположения о значимых видовых дифференциациях бластоцист [9]. Кроме того, морфология простейших может изменяться под влиянием многих химических и физических факторов хозяина и внешней среды. Молекулярно – генетический анализ разных изолятов бластоцист человека и животных позволил выделить 17 субтипов (СТ1-17) бластоцист, из которых 9 - обнаружены в организме человека [10, 11]. Эти особенности затрудняют как идентификацию бластоцист при диагностике, так и расшифровку их жизненного цикла, представленного в виде гипотетических схем, основанных на существовании основных и переходных стадий микроорганизма.

существующего организма [12, 13]. Согласно данным многочисленных авторов до настоящего времени нет единого мнения о жизненном цикле *Blastocystis spp.* [14, 15] и о способах деления [16, 17], как действительно присутствующих в жизненном цикле паразита. Описано несколько репродуктивных вариантов, но доказанным, наиболее часто выявляемым и хорошо известным является только размножение клеток путем бинарного деления [18, 7, 10].

С помощью светового микроскопа показано, что из двухъядерной клетки формируются две одноядерные дочерние. Видны все переходные формы, начиная от овальной с еле заметной перетяжкой посередине и гантелевидной до полного расхождения сформированных круглых или овальных одноядерных клеток с распределением органелл в обеих половинах (рисунок 1АБ). Этот способ часто происходит в вакуолярных и гранулярных формах бластоцист, редко в мультивакуолярных [1, 19].

Данных по митотическому делению у

Рисунок 1. Микрофото гранулярной формы бластоцист в процессе бинарного деления из культуры *in vitro* и свежего материала [27].

А. переходная форма с перетяжкой посередине (стрелки);

Б. гантелевидная форма. CV-центральная вакуоль, N-ядро, М-митохондрияподобные органеллы.

Настоящая публикация предпринята с целью обобщить существующие варианты размножения бластоцист и рассмотреть наиболее выраженные характеристики полиморфно

бластоцист к настоящему времени нет. Тем не менее, сведения о том, что деление бластоцисты начинается с разделения родительского ядра внутренней мембраной на две части с

А

Б

Рисунок 2. Микрофото деления ядра в клетке бластоцист из изолятов от человека [27].

А. делящееся ядро (N);

Б. два дочерних ядра, окруженные внешней ядерной оболочкой.

последующим делением внешней мембраны и образованием двух отдельных ядер (рисунок 2АБ) [19], как описано у *Eimeria necatrix* [20] подтверждается наблюдениями в изолятах из

А

Б

Рисунок 3. Микрофото бластоцист в фазе размножения по типу шизогонии из культуры in vitro [27].

А. шизонто развивающаяся клетка;

Б. центральная вакуоль шизонта с наличием нескольких дочерних клеток (стрелки).

свиней [21] и в изолятах из человека [22].

В работах ряда авторов описаны так же другие варианты размножения бластоцист такие как, почкование, плазмотомия, эндодиогения,

Рисунок 4. Микрофото клетки бластоцист в процессе деления по типу эндодигонии. Два дочерних организма в родительской клетке [33].

шизогония, множественное деление в тонко и толстостенных цистах, образование потомства в мешкоподобных вакуолях и возможная репродуктивная роль гранул центральной вакуоли бластоцист, но они не являются общепризнанными и не имеют подтверждающих доказательств [23, 24].

Размножение по типу шизогонии (образование множества ядер в центральной вакуоли с формированием из них одноядерных особей) было продемонстрировано при помощи фазово-контрастной микроскопии в культуре *in vitro* Zierdt (1991) и характеризуется быстрым нарастанием числа дочерних особей в центральной вакуоле (репродуктивной органелле) (рисунок 3А). Потомство заполняет родительскую клетку (шизонт) (рисунок 3Б) и разрывая оболочку, выходит в окружающую среду. Число потомков колеблется от одного до сотен, причем организмы уменьшаются в размерах по мере увеличения их численности. В одном шизонте могут находиться особи разного размера и степени развития. Жизнеспособное потомство описывают как крошечные, темные, плотные, не преломляющие свет клетки и, возможно, более устойчивые к воздействию воздуха, высыханию и более низким темпера-

турам [25].

Представленные Zierdt наблюдения о делящейся форме бластоцист с образованием двух крупных дочерних особей с центральными вакуолями под оболочкой материнской клетки позволили утверждать, что в жизненном цикле существует процесс деления по типу эндодигонии (рисунок 4) [26].

В постоянно окрашенных по Романовскому – Гимзе и железным гемотоксилином Гайденайна препаратах из свежего нативного материала и культуры *in vitro* были найдены *Blastocystis* spp. в процессе почкования (двойное, тройное, множественное) (рисунок 5 А,Б), о чем сообщает Yamada с соавторами [19]. В культуре *in vitro* почкующиеся дочерние организмы меньше материнской клетки, отделяются от нее и содержат много ядер в цитоплазме. Процесс почкования у бластоцист наблюдали при лекарственном и пищевом стрессах [26].

Существуют работы, где с помощью световой микроскопии описан процесс плазмотомии у амeboидных форм бластоцист, как один из возможных механизмов репродукции [23, 27]. Согласно данным о морфологии и биологии паразита, амeboидные формы являют-

Рисунок 5. Микрофото бластоцист в процессе почкования из культуры *in vitro* [27].

А. тройное почкование клетки;

Б. множественное почкование клетки (стрелки).

ся стадией жизненного цикла *Blastocystis* spp. [28]. Эти формы можно было идентифицировать, в основном, в культурах, выделенных от пациентов с функциональными симптомами нарушения ЖКТ [28, 29, 30, 24], предполагая наличие потенциально патогенных свойств бластоцист [31].

Методы исследования окрашенных препаратов позволили Тану и Сурешу (2007) подтвердить информацию о плазмотомии [17]. Окраска трихромом и акридиново-оранжевым центральной зоны амeboидной формы бластоцист в различные оттенки красно-ко-

Рисунок 6. Микрофото амeboидной формы бластоцист во время плазмотомии. Отщепление потомства бластоцист от материнской клетки (стрелка). Потомство содержит электронно-плотные митохондрии (m), несколько небольших вакуолей (v) и полностью окружено поверхностным слоем (sc) [42].

ричневого и желто-оранжевого цветов соответственно, указывает на высокий уровень ДНК и синтез белков перед делением клетки [32, 33]. Происходит образование нескольких ядер с последующим разделением и отщеплением вытянутой цитоплазмы от тела клетки на две и более дочерних особи, о жизнеспособности которых можно судить по наличию у них электронно-плотного поверхностного слоя, митохондрий и нескольких вакуолей (рисунок

Рисунок 7. Микрофото толстостенных и тонкостенных цист бластоцист [45].

6). Можно предположить, что для возникновения плазмотомии в культуре *in vitro* требуются определенные условия [17].

Группа ученых из национального университета Сингапура опубликовала результаты экспериментальных данных по доказательному описанию структурной организации цист бластоцист и их роли в жизненном цикле. Согласно данным, тонкостенные цисты (аутоинфекционные) отвечают за размножение в желудочно-кишечном тракте хозяина, а цисты с толстой оболочкой участвуют во внешней передаче паразита (рисунок 7) [34]. Морфологию клеток изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии, а ядерные структуры - методом окраски акридиново-оранжевым [35].

Вакуолярные клетки бластоцист делятся бинарно и дают начало двум видам цист, развивающихся разными путями. В цикле внешней передачи из вакуолярной формы последовательно развиваются: амeboидная форма (через 6 часов культивирования), прециста (через 48 ч) и циста (через 6 дней). На микрофотографиях поверхностный слой цисты плотный и утолщенный с пороподобными отверстиями на внешней мембране, через которые мелкосферические образования вытесняются наружу (результат множественного деления).

Аутоинфекционный путь рассматривают как последовательное созревание мультивакуолярной и прецистной форм бластоцист, за-

Рисунок 8. Микрофото мультивакуолярной формы бластоцист из культуры кишечного содержимого домашних ящериц [47].

А. мультивакуолярная форма, содержащая три большие вакуоли, ограниченные отчетливой мембраной (Me). Показан разрыв одной из вакуолей, которая высвобождает потомство (P);

Б. увеличение одной из вакуолей. Отчетливая мембрана (Me), придающая мешкообразный внешний вид вакуоли. Потомство (P) с четким ядром (N) и центральным телом (CB) внутри вакуоли.

канчивающих свое развитие цистой с тонкой оболочкой и наличием внутри паразита развивающегося по типу шизогонии. Сформировавшиеся дочерние вакуолярные особи, разрывая

Рисунок 9. Микрофото гранулярной формы бластоцист из культуры in vitro [48].

А. гранулярная форма с репродуктивными гранулами;

Б. увеличение репродуктивной гранулы, представляющей собой небольшую вакуолярную форму бластоцист с типичным периферическим электроно-плотным ядром.

оболочку, освобождались и процесс повторялся [34].

В исследованиях по изучению культуры из кишечного содержимого ящериц Suresh выявил мультивакуолярные формы бластоцист, предполагая, участие вакуолей в размножении паразита. Вакуоли (не менее трех), ограниченные четкой мембраной, выглядят как мешок, содержащий гранулы и увеличенные митохондрии с выпуклыми кристами (рисунок 8АБ). На рисунке 8А показан разрыв в мембране одной из вакуолей и выход гранул во внутреннее содержимое материнской клетки. При более высоком увеличении, видно, что гранулы имеют ядро и вакуоль, что характерно для развивающегося потомства [36].

Об участии гранул центральной вакуоли в размножении бластоцист сообщает Dhurga с соавторами (2016) в статье по изучению влияния метранидозола на клетки *Blastocystis* spp., провоцирующего запуск апоптических механизмов [37]. В результате чего, вакуолярные формы бластоцист развиваются в гранулярные апоптические двух видов: нежизнеспособные, погибающие и жизнеспособные, гранулы которых дают начало мелким вакуолярным клеткам с их последующим освобождением.

Гранулы (от 5 до 16 шт.) визуализировали через 12 часов после обработки метранидозолом. Окрашивание акридиново-оранжевым и DAPI демонстрируют ярко-зеленую флуоресценцию и синий цвет гранул соответственно, что указывает на присутствие ДНК. Это может быть результатом массивной клеточной реорганизации, происходящей вследствие инициирования апоптотической активности. Через 72-84 ч. интенсивность окраски гранул снижается, обнаруживая небольшие вакуолярные формы *Blastocystis* spp. внутри электронно-плотных гранулярных форм (рисунок 9АБ). О том, что вакуоль является местом развития гранул, ранее сообщил с соавторами [38].

Таким образом, увеличение репродуктивного потенциала и уровня жизнеспособных вакуолярных клеток за счет формирования гранулярных форм [39, 40] на фоне активации механизмов апоптоза позволяет предположить наличие еще одного способа бесполого размножения у *Blastocystis* spp. [41, 42].

Хотя *Blastocystis* - это один из распространенных кишечных простейших, обнаруживае-

мый в образцах фекалий человека и животных, таксономия и разнообразные способы размножения до сих пор полностью не изучены и это является одной из основных проблем, связанных с изучением биологии паразита. Некоторые морфологические признаки в световой и электронной микроскопии противоречивы в отношении этого паразита и к настоящему времени нет единого мнения в этих вопросах.

Tan и Stenzel (2003) предположили, что потомство, как модель размножения, должно содержать генетический материал и развиваться в жизнеспособные взрослые клетки. В этом случае недостаточно применения только световой и электронной микроскопии [16]. Для визуализации ядерных структур простейших, необходимо использовать разные приемы окрашивания, учитывая вместе молекулярные, биохимические, биофизические и ультраструктурные методы исследования

В целом предпринятая попытка систематизировать данные о режимах репродукции *Blastocystis* spp. должна быть продолжена с целью уточнения накопленных сведений к расшифровке его жизненного цикла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belova LM. World fauna and morphofunctional organization of the *Blastocyst* (Protista, Rhizopoda). Saint-Petersburg: 1992.-С. 10-53. (in Russian).
2. Scanlan P D, Stensvold C R, Rajilić-Stojanović M, Heilig H G, De Vos W M, O'Toole P W, Cotter P D. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. FEMS Microbiology ecology. 2014; 90(1):326-30. DOI: 10.1111/1574-6941.12396.
3. Omar M. Amin. The Epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. Research Journal of Parasitology 2006, 1: 1-10. DOI: 10.3923/jp.2006.1.10.
4. Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armanet C, Couloux A, Poulain J, Segurens B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng G C, Tan K S, Artiguenave F, Jaillon O, Aury J M, Delbac F, Wincker P, Vivarès C P, El Alaoui H. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. Genome Biol. 2011;12(3):R29. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-r29. Epub 2011 Mar 25.
5. Baldauf, Sandra L. (2008). «An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes» (PDF). Journal of Systematics and Evolution. 46 (3): 263–73. doi:10.3724/SP.J.1002.2008.08060 (inactive 2019-08-20).
6. Kostka M, Hampl V, Cepicka I, Flegr J. Phylogenetic position of *Protoopalina intestinalis* based on SSU rRNA gene sequence. Mol Phylogenet Evol. 2004 Oct;33(1):220-4.
7. Stenzel D J., Boreham P F. *Blastocystis hominis* revisited. Clinical microbiology reviews. 1996; 9(4):563-84.
8. Tan KS, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: Hot spots in terra incognita. International journal for parasitology. 2002;32(7):789-804.
9. Stenzel DJ, Lee MG, Boreham PF. Morphological differences in *Blastocystis* – an indication of different species. Parasitology research. 1997; 83(5):452–7.
10. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clinical microbiology reviews. 2008; 21(4):639-65;doi:10.1128/CMR.00022-08.
11. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IK, M B Hossain, Zaman V, Haque R and Takahashi Y. 2004. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. Parasitol. Res. 92:22-29.
12. Продеус Т.В., Федянина Л.В., Фролова А.А. Морфологическая идентификация бластоцист. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2014;1:9-13 [Prodeus, T.V., Fedianina, L.V., Frolova, A.A. Morphological identification of blastocystis. Med. parazitol. (Mosk)1:2014, P. 9-13 - in Russian].
13. Федянина Л.В., Продеус Т.В., Соловьева О.А. Лабораторная диагностика *Blastocystis* spp. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2012;4:52-57 [Fedianina, LV, Prodeus, TV, Solov'eva OA. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. Med. parazitol. (Mosk) 4:2012, P. 52-58 - in Russian]
14. Govind SK, Anuar KA, Smith H V. Response to Tan and Stenzel, and Windsor et al. *Blastocystis* reproduction and morphology. Trends in Parasitology (2003) 19:291–292.
15. Tan KS, Stenzel DJ. Multiple Reproductive processes in *Blastocystis*: proceed with caution. Trends in parasitology. 2003;19(7):291–2.
16. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. Parasitology today. 1988;4(1):15–7.
17. Tan TC, Suresh KG. Evidence of plasmotomy in *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 2007;101(6):1521–5. doi: 10.1007/s00436-007-0670-0.
18. Govind SK, Khairul A A, Smith H V. Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. Trends in parasitology. 2002;18(12):528.
19. Minoru Y, Hisao Y. Morphology of Human and Animal *Blastocystis* Isolates with Special Reference to Reproductive Modes. In: Heinz M., Kevin S.W., Tan.,

- Hisao Y., eds. *Blastocystis*: Pathogen or Passenger?; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012:3-25.
20. Dubremetz JF. Ultrastructural study of schizogonic mitosis in the coccidian, *Eimeria necatrix* (Johnson 1930)]. J Ultrastruct Res. 1973; 42(2):354–76.
 21. Pakandl M. *Blastocystis* spp. from pigs: ultrastructural changes occurring during polyxenic cultivation in Iscove's modified Dulbecco's medium. Parasitology research. 1999; 85:743–748
 22. Yoshikawa H, Yamada M, Yoshida Y. Freeze-fracture study of *Blastocystis hominis*. The Journal of Protozoology. 1988; 35 (4): 522–8.
 23. Zhang X, Qiao J Y, Zhou X J, Yao F R, Wei Z C. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. Parasitology research. 2007; 101(1): 43–51 Doi:10.1007/s00436-006-0439-x.
 24. Zhang X, Zhang S, Qiao J, Wu X, Zhao L, Liu Y, Fan X. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. Parasitology research. 2012; 110 (3):1165–72 Doi:10.1007/s00436-011-2607-x.
 25. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*—past and future. Clinical microbiology reviews. 1991;4(1):61–79 DOI: 10.1128/CMR.4.1.61.
 26. Suresh K. et al. Budding in *Blastocystis*. Int. Med. Res. J. 1998; 2: 13-14.
 27. Zaman V. Phase-contrast microscopy of cell division in *Blastocystis hominis*. Annals of tropical medicine and parasitology. 1997; 91(2):223-4.
 28. Singh M, Suresh K, Ho L C, Ng G C, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. Parasitology research. 1995; 81(5):446–50.
 29. Tan TC, Suresh KG. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - a detailed ultrastructural insight. Parasitology research. 2006; 99(6):737–42. Doi: 10.1007/s00436-006-0214-z.
 30. He N, Zhang YQ, Hong ML, Cong M. Morphological and ultrastructural observation of *Blastocystis hominis*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing ZaZhi. 2001;19(3):169–172.
 31. Tan TC, Suresh KG. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. Parasitology research. 2006; 98(3):189–93. Doi: 10.1007/s00436-005-0033-7.
 32. Villar J, Carbajal J A, Lanuza M D, Munoz C, Borrás R. In vitro encystation of *Blastocystis hominis*: a kinetics and cytochemistry study. Parasitology research. 1998; 84(1):54-8.
 33. Suresh K, Ng G C, Ho LC, Yap E H, Singh M. Differentiation of the various stages of *Blastocystis hominis* by acridine orange staining. International journal for parasitology. 1994;24(4):605 – 6
 34. Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. Parasitology research. 1995; 81(5):446 – 50
 35. Suresh K, Howe J, Chong SY, Ng GC, Ho LC, Loh A.K., Ramachandran N.P., Yap E.H., Singh M. Ultrastructural changes during in vitro encystment of *Blastocystis hominis*. Parasitology research. 1994; 80(4):327 – 35
 36. Suresh K, Mak J W, Chuong L S, Ragunathan T, Init I. Sac-like pouches in *Blastocystis* from the house lizard *Cosymbotus platyurus*. Parasitology research. 1997; 83(6):523–5
 37. Dhurga DB, Suresh K, Tan TC. Granular Formation during Apoptosis in *Blastocystis* spp. Exposed to Metronidazole (MTZ). PloSOne. 2016;11(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0155390 .
 38. Zierdt CH, Williams R L. *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. Experimental parasitology. 1974; 36(2): 233–43.
 39. Fröhlich K U, Madeo F. Apoptosis in yeast - a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. FEBS letters. 2000;473(1):6–9.
 40. Jin C, Reed J C. Yeast and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3(6):453–9.
 41. Sienzel DJ, Boreham PF, McDougall R. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. International journal for parasitology. 1991; 21(7):807–12.
 42. Haresh K, Suresh K, Khairul Anus A, Saminathan S. Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. Tropical Medicine and International Health. 1999; 4(4): 274–7.

Поступила 05.10.19