

**НЕОРГАНИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОБОЛОЧКИ МИКСОСПОР
HENNEGUYA OVIPERDA (COHN, 1895) И *MYXOBOLUS PSEUDODISPAR* (GORBUNOVA, 1936)
(MYXOZOA)**

© П. Ю. Тютяев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; электронный адрес: Lythrum@mail.ru

С помощью цитохимических методов и атомно-абсорбционной спектроскопии проведен анализ содержания органических и неорганических веществ в оболочках зрелых длительно содержавшихся в воде микоспор микоспориций *Henneguya oviperda* (Cohn, 1895) и *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936). Отмечено высокое содержание кремния (91—94 %), а также катионов кальция, магния, железа и марганца.

Ключевые слова: атомно-абсорбционная спектроскопия, элементы, кремний, микоспориции, *Henneguya oviperda* (Cohn, 1895) и *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936).

По современным представлениям, жизненный цикл многих видов микоспориций осуществляется путем чередования двух фаз развития (микоспорейной и актиноспорейной), а также двукратной сменой хозяев (Wolf, Markiw, 1984; El-Mathbouli, Hoffmann, 1992; Grosshaeder, Körting, 1992; Kent et al., 1993; Yokayama et al., 1997; Успенская, 1995, и др.). Микоспорейная фаза протекает в позвоночном хозяине, главным образом в рыбах, а актиноспорейная — в беспозвоночном, главным образом в олигохетах. Каждая фаза подразделяется на два периода — паразитический и свободноживущий. Паразитический период микоспорейной фазы заканчивается образованием микоспоры, а паразитический период актиноспорейной фазы — образованием актиноспоры, которые выводятся во внешнюю среду (воду) и проходят период покоя, служа одновременно и для инвазии новых особей хозяев, и для расширения ареала паразита, дисперсии (Успенская, 1984, 1993, 1997; Успенская, Райкова, 2001). В последнее время вновь появляются работы, в которых экспериментально доказывается существование у микоспориций однохозяинных циклов с передачей паразита от рыбы к рыбе (Diamont, 1997).

Актиноспоры и микоспоры сильно различаются морфологически, но слагаются из одинаковых элементов, хотя количество этих элементов у них разное. Оболочка спор состоит из створок, соединенных друг с другом. В месте соединения имеется шов, края которого часто образуют утолщение — шовный валик. Створки споры могут иметь различные выросты и ребрышки на поверхности. Внутри споры располагается спороплазма (амебодный зародыш) — инвазионное начало, а также стрекательный аппарат, представленный стрекательными капсулами со свернутой внутри них стрекательной нитью. Количество створок, зародышей и стрекательных капсул различно у разных видов микоспор и у актиноспор.

Актиноспоры, заражающие рыб, имеют непродолжительный (10—14 сут) период покоя (Xiao, Desser, 2000), к

тому же они не очень устойчивы к внешним воздействиям. Створки их достаточно эластичны, они легко раскрываются, и спороплазма (инвазионное начало) выходит из них. В отличие от актиноспор микоспоры, при двуххозяинном цикле заражающие беспозвоночных, а при однохозяинном — рыб, имеют продолжительный период покоя (Plehn, 1924; Lom, 1964; Успенская, 1984; Успенская, Райкова, 2001, и др.) и очень устойчивы к внешним воздействиям: они выдерживают значительную соленость, длительное высушивание и замораживание (Успенская, 1984). Лом (Lom, 1964) пришел к выводу о том, что створки микоспор состоят из очень прочных белков, скорее всего, кератиноподобных. По данным некоторых авторов, они дают положительную цитохимическую реакцию на общий белок (Успенская, 1984).

Микоспоры не удается растворить или раскрыть в лабораторных условиях без повреждения находящейся внутри спороплазмы. Оболочки их очень упруги, их не удается проткнуть или разрезать стеклянными микроманипуляторами, они не перевариваются ни в пепсине, ни в трипсине, ни в проназах К и Е, не растворяются в лизоциме и додецилсульфате (Успенская, 1984). Это обстоятельство мешает изучению ядерного цикла микоспориций и экспериментальному изучению механизмов инвазирования паразитом хозяев. Поэтому необходимо более подробное изучение химического состава оболочек микоспор, в том числе неорганических веществ, участвующих в ее построении. Ранее были предприняты некоторые шаги в этом направлении (Siau, 1978), но полученные данные недостаточно полны. Был проведен микроанализ содержимого неорганических веществ в актиноспоре (Marques, 1984).

В задачу настоящего исследования входила качественная и количественная оценка неорганических компонентов, составляющих оболочку зрелых спор микоспориций, длительно хранившихся в воде. Хотелось также выяснить, что позволяет споре длительно сохранять фор-

му, сохраняются ли в оболочках таких спор какие-либо органические вещества после гибели внутри нее спороплазмы.

Материал и методика

Для исследования неорганического состава створок (оболочек) микоспор мы использовали длительно (с 1996 по 2005 г.) выдержанные в воде при 4 °С микоспоры: *Henneguya oviperda* (Cohn, 1895) из ооцитов щуки *Esox lucius* L. и споры *Mухоболus pseudodispar* (Gorbunova, 1936) из мышц плотвы *Rutilus rutilus* L. Эти материалы были любезно предоставлены А. В. Успенской (Институт цитологии РАН). Веретеновидные, слегка закругленные на переднем конце микоспоры *H. oviperda* имеют оболочку, состоящую из двух створок, каждая из которых заканчивается длинным одинарным хвостовым отростком; две грушевидные стрекательные капсулы, расположенные на переднем конце споры; позади капсул располагается одна двуядерная спороплазма (длина спор 17—22 мкм, вместе с хвостовыми отростками до 36 мкм, ширина спор 9—10 мкм, длина полярных капсул до 11 мкм, ширина 2.5 мкм). Материал был тщательно очищен от остатков ооцитов и крови хозяина. После длительного (около 9 лет) содержания в воде в этом материале присутствовали лишь оболочки спор, состоящие из двух створок и сохраняющие присущую данному виду микоспоридий форму. Внутри спор находились оболочки стрекательных капсул. Амебодный зародыш и содержимое стрекательных кап-

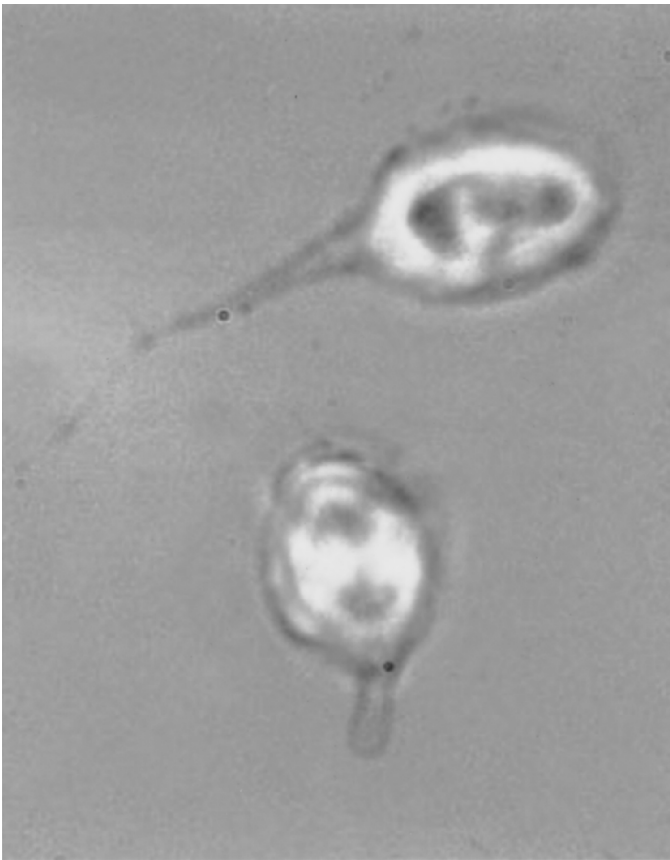


Рис. 1. Длительно хранящиеся в воде микоспоры *Henneguya oviperda* (Cohn, 1895).

1000×.

сул уже дегенерировали (рис. 1). Споры *M. pseudodispar* имеют овальную форму, длина спор 10—12 мкм, ширина — 7—9 мкм. Споры содержат две неравные полярные стрекательные капсулы диаметрами 3.0 и 2.6 мкм. Материал тщательно очищали от мышечных волокон рыбы. За продолжительный срок нахождения в воде спороплазма и содержимое стрекательных капсул также дегенерировали (рис. 2).

Для выявления в оболочке органических соединений споры были подвергнуты прокаливанию при 400 °С и воздействию неорганических кислот и щелочей. Мы помещали микоспоры в растворы ферментов коллагеназы и савиназы и инкубировали их при оптимальных условиях в течение 10 сут. Также мы использовали различные растворы, содержащие меркаптоэтанол, мочевины, ацетонитрил и трифторуксусную кислоту, способные денатурировать и растворять белки.

Для обнаружения белков использовали общеизвестные гистохимические реакции, а также специфические методы обнаружения склеропротеинов. Нами были использованы следующие методики: реакция Милона, методы для выявления аминокрупп, связанных с белками (метод нингидрин — реактив Шиффа, хлорамин Т — реактив Шиффа), специфические реакции на определенные аминокислоты (метод с диметиламинобензальдегидом и нитритом натрия для выявления остатков триптофана, метод с наф-

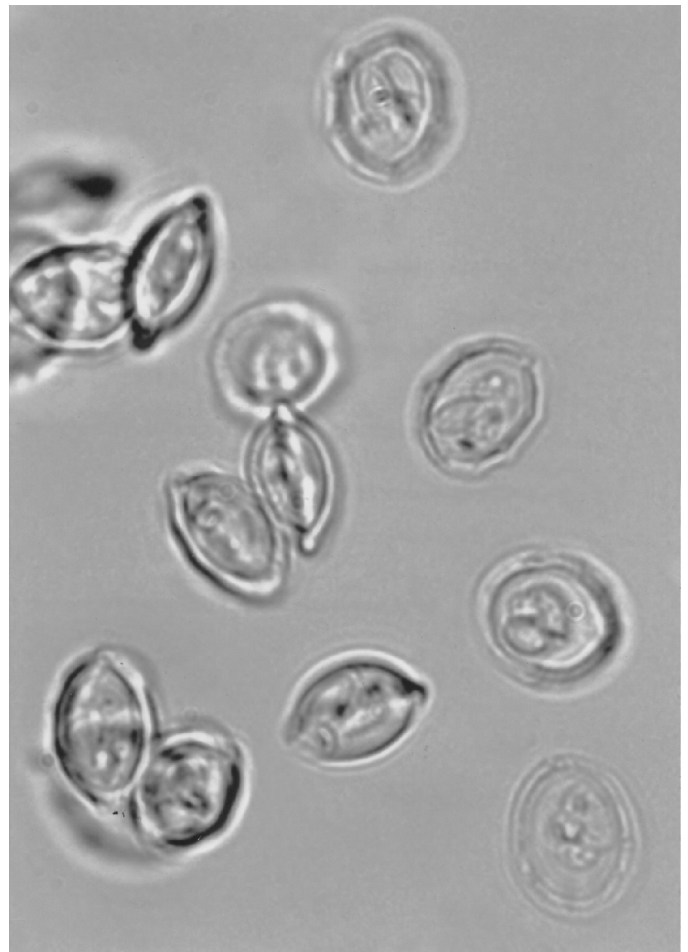


Рис. 2. Длительно хранящиеся в воде микоспоры *Mухоболus pseudodispar* (Gorbunova, 1936).

1000×.

тилэтилендиамином для той же цели, реакция Сакагуши для выявления остатков аргинина), а также ферри-феррицианидный метод и щелочная тетразолиевая реакция для выявления SH- и SS-групп.

Для обнаружения склеропротеинов использовали методы Маллори, методы серебрения, метод с надмуравьиной кислотой и альциановым синим, окрашивание по Вергёффу и реакции ШИК после обработки диастазой и тетразониювого сочетания, после 18-часового бензоилирования (Пирс, 1962).

Присутствие кератинов определяли по следующему методу: проводили 48-часовой гидролиз спор в щелочной среде, навеску спор (0.01 г) заливали 3 мл 2%-ного гидроксида натрия и оставляли на 48 ч при комнатной температуре. По прошествии 2 сут споры центрифугировали, а гидролизат подвергли спектрофотометрическому исследованию. Спектр снимали на спектрофотометре Shimadzu в интервале длин волн от 220 до 400 нм. По такой же схеме проводили изучение кислого гидролизата, полученного путем действия на споры в тех же условиях 2.2 н. хлористоводородной кислоты. Параллельно по тем же методикам гидролизовали стандартный образец кератина из пера птицы с последующей спектрофотометрией при тех же длинах волн.

Для обнаружения кремния мы применяли стандартные методы, основанные на физико-химических свойствах соединений этого элемента (способность растворяться в растворах фтористоводородной кислоты, образовывать газообразный фторид кремния, переходы геля кремниевой кислоты в золь и наоборот и т. д.) (Weiss, Herzog, 1977; Simpson, 1984; Perry, 1989). Качественное и количественное определение элементов в объекте проводили с помощью атомно-абсорбционного спектрометра с электротермическим атомизатором Zeeman/3030 по общеизвестным методикам (Прайс, 1976). Для определения кремния использовали лампу с полым катодом и аргон газообразный по ГОСТ 10157. Измерения проводили при длине волны 251.6 нм в кювете с пиролитическим покрытием и платформой. Температура атомизации составляла 2650 °С (Карпов, Юделевич, 1985; Карпов, 1988).

Результаты и обсуждение

Мы согласны с мнением Лома (Lom, 1964) о том, что в состав оболочки живой споры могут входить высокоустойчивые белки (коллагены или кератины) и это объясняет долгий срок ее сохранения. Данное предположение основывается еще и на том, что и в организме рыб (хозяев этого вида паразитов) в большом количестве содержатся различные коллагены и белок ихтеолипидин — основная составляющая чешуи рыб; эти белки обладают наибольшей устойчивостью к перепадам температур, pH среды, концентрации катионов и анионов. Для подтверждения этой гипотезы было проведено несколько эксперимен-

тов. Белки предполагалось обнаружить с помощью общеизвестных гистохимических реакций, основанных на химических и физико-химических свойствах склеропротеинов.

В выдержанном длительное время в воде материале, где сохранились лишь створки спор, нам не удалось обнаружить с помощью специфических окрашиваний присутствие какого-либо из белков, поскольку они, вероятно, денатурировали при таком длительном хранении. Окрашивалась лишь узкая область, представляющая собой тонкий слой оболочки, граничащий с внутренней полостью споры. Это окрашивание можно объяснить неспецифической сорбцией избытка красителей. Большинство использованных методик основано на принципе химического взаимодействия аминокислот белков с соответствующими красителями, и полученные отрицательные результаты, по нашему мнению, могут свидетельствовать об отсутствии белков в исследованном материале. Мы подтвердили наше предположение о небелковой природе нашего материала общими гистохимическими реакциями на протеины. Нами был получен отрицательный результат при использовании всех методик, из чего можно сделать вывод о том, что хранившиеся столь длительное время в воде оболочки спор не содержат белков или же содержат их в следовых количествах. В результате проведенного изучения спектров поглощения гидролизатов испытуемых створок спор не было обнаружено максимумов при длинах волн 280, 275 и 270 нм, характерных для ароматических аминокислот, что также свидетельствует об отсутствии в них белков.

Для подтверждения отсутствия в оболочке длительно хранящихся спор органических соединений эти споры подвергали прокаливанию, воздействию неорганических кислот и щелочей и действию протеолитических ферментов. В результате воздействия высокой температуры оболочка споры частично теряла первоначальную форму (вероятно, расплавлялась), но ее цвет и прозрачность не изменялись. Не обнаружили мы также образования гари и копоти и других видимых признаков высокотемпературной деструкции органических веществ. Часть спор помещали в 10%-ный раствор соляной кислоты на 7 сут, после чего раствор кислоты заменяли 20%-ным раствором гидроксида натрия. После этой обработки видимых различий в строении створок спор не обнаружили. Кроме того, испытуемые створки споры не изменялись под воздействием агентов, способных денатурировать и растворять белки (меркаптоэтанола, мочевины, ацетонитрила и трифторуксусной кислоты). Ферменты коллагеназы и савиназы в оптимальных условиях не растворяли оболочки спор. Можно предположить, что подобная устойчивость спор к высоким температурам и колебаниям pH обусловлена присутствием в составе споры достаточно инертного неорганического вещества. Так как оболочка спор практически не изменялась как в кислой, так и в щелочной среде, было предположено, что в ее состав входят силикаты, тем бо-

Содержание элементов, %, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$, в спорах *Henneguya oviperda* (Cohn, 1895) и *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936) в пересчете на абсолютно сухие споры

Споры	Элементы								
	Ca	Mn	Fe	Si	Mg	Cu	Al	Ni	Cr
<i>H. oviperda</i>	2.10 ± 0.06	1.80 ± 0.03	0.60 ± 0.01	91.00 ± 0.05	1.30 ± 0.05	0.40 ± 0.02	1.10 ± 0.03	0.90 ± 0.03	0.80 ± 0.06
<i>M. pseudodispar</i>	1.50 ± 0.05	1.60 ± 0.03	0.60 ± 0.01	94.00 ± 0.01	0.80 ± 0.06	1.10 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.10 ± 0.06	0.10 ± 0.03

лее что у актиноспор кремний был обнаружен в значительном количестве (Marques, 1984). При сравнении результатов анализа физико-химических свойств спор с литературными данными о свойствах других кремнийсодержащих биологических объектов (Schwarz, 1977; Voronkov, 1977; Simpson, Volcani, 1981) было обнаружено, что они схожи.

Для подтверждения этой гипотезы споры помещали в 10%-ный водный раствор фторида аммония в присутствии разбавленной серной кислоты. Через 36 ч все створки растворились. Для обнаружения кремния использовали стандартный подход к анализу объектов, содержащих силикаты. При действии на споры концентрированной плавиковой кислоты они теряли свою форму и осаждались в виде осадка — геля кремниевой кислоты. Осадок центрифугировали и отмывали водой. При нагревании осадка до 100 °С с 10-кратным количеством воды и последующем охлаждении была получена студенистая масса, что указывает на присутствие кремниевой кислоты. Небольшое количество спор помещали в центр платинового тигля, прибавляя избыток концентрированных плавиковой и серной кислот и нагревали на спиртовке. Наблюдали выделение газообразного фторида кремния. Качественная реакция с молибдатом аммония и бензидином на анионы кремния также оказалась положительной (синее окрашивание). Для количественного определения элементов в спорах использовали метод атомно-абсорбционной спектроскопии. Результаты приведены в таблице.

В результате изучения химического состава оболочек микроспор *Henneguya oviperda* и *Myxobolus pseudodispar*, длительно хранившихся в воде и лишенных амeboидных зародышей и содержимого стрекательных капсул, но тем не менее сохранивших форму, присущую микроспорам данного вида микоспоридий, установлено, что их оболочки практически не содержат белков и состоят из неорганических веществ, которые и позволяют им сохранить первоначальную форму. В их состав входят такие катионы, как кальций, марганец, железо, медь, алюминий, хром, никель и магний, а также до 94 % кремния. Содержание кремния в микоспорах оказалось значительно выше, чем в актиноспорах (Marques, 1984).

Автор выражает сердечную благодарность А. В. Успенской за предоставленный материал и ценные советы при подготовке работы к печати.

Список литературы

- Карпов Ю. А. 1988. Анализ высокочистых неорганических веществ. М.: Знание. 32 с.
- Карпов Ю. А., Юделевиц И. Г. 1985. Методы количественного определения кремния в биологических объектах. Журн. анал. хим. 40 (5) : 373—384.
- Пирс Э. 1962. Теоретическая и прикладная гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 962 с.
- Прайс В. 1976. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия. М.: Мир. 355 с.
- Успенская А. В. 1984. Цитология микоспоридий. Л.: Наука. 112 с.
- Успенская А. В. 1993. Новые проблемы в изучении Мухозоа. Паразитология. 27 (5) : 369—374.
- Успенская А. В. 1997. Жизненный цикл микоспоридий в свете новых данных по их биологии. В кн.: Сб. науч. тр. Н.-и. ин-та озерного и речного рыбного хозяйства. Л.: Наука. 321 : 81—107.
- Успенская А. В., Ракова Е. В. 2001. Цитологические аспекты сходства и различия микоспоридий и книдарий. Цитология. 43 (3) : 284—309.
- Diamont A. 1997. Fish-to-fish transmission of marine myxosporidians. Dis. Aquat. Org. 30 : 99—105.
- El-Matbouli M., Hoffmann R. W. 1992. Experimental transmissions of two *Myxobolus* sp. developing bisporogony via tubificid worms. Parasitol. Res. 75 : 461—464.
- Grosshaeder G., Korting W. 1992. First evidence that *Hofelers cyprini* (Doflein, 1898) is transmitted by *Nais* sp. Bull. Eur. Assoc. Fish Patol. 12 : 17—20.
- Kent M. L., Whitaker D. L., Margolis L. 1993. Transmission of *Myxobolus arcticus* (Pugachev and Khokhlow, 1979) a myxosporidian parasite of pacific salmon via a triactinomyxon from the aquatic oligochaete *Stilodrilus heringianus* (Lumbricidae). Can. J. Zool. 72 : 932—937.
- Loim J. 1964. Notes on the extrusion and some other features of myxosporidian spores. Acta Protozool. 2 : 322—327.
- Marques A. 1984. Contribution a la connaissance des Actinomyxides: ultrastructure, cycle biologique, systematique. These presente a l'Universite des Sciences et Techniques de Languedoc pour obtenir le grad Docteur d'Etat. Montpellier. 281 p.
- Perry C. C. 1989. Biomineralization: chemical and biochemical perspectives Weinheim, Germany; VCH. 356 p.
- Plehn M. 1924. Praktikum der Fischerkrankheiten. Stuttgart. 300 S.
- Schwarz K. 1977. Biochemistry of silicon. In: Biochemistry of silicon and related problems. New York: Plenum. 64 : 207—230.
- Siau Y. 1978. Contribution la connaissance des Myxosporides: etude de *Myxobolus exiuns*. Thelohon., 1895 (cytology, cycle, actions sur l'hote, epidemiologie). Ph. D. dissertation, University of Science and technology. Montpellier, France.
- Simpson T. L. 1984. The cell biology of sponges. New York: Springer. 700 p.
- Simpson T. L., Volcani B. E. 1981. Silicon and siliceous structures in biological systems. New York: Springer. 698 p.
- Uspenskaya A. V. 1995. Alternation of actinosporean and myxosporidian phase in the live cycle of *Zschokkela nova* (Myxozoa). J. Euk. Microbiol. 42 : 665—668.
- Voronkov M. G. 1977. Isolation of silicon ex cell. In: Biochemistry of silicon and related problems. New York: Plenum. 66 : 395—434.
- Weiss A., Herzog A. 1977. Signification of silicon in cell. In: Biochemistry of silicon and related problems. New York: Plenum. 65 : 109—128.
- Wolf K., Markiw M. E. 1984. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discovers show alternation in invertebrate and vertebrate hosts. Science. 225 : 1449—1452.
- Xiao C., Desser S. S. 2000. The longevity of actinosporean spores from oligochaetes of lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario and their reaction to fish mucus. J. Parasitol. 86 : 193—195.
- Yokoyama H. et al. 1997. Transmission of *Thelohanellus hovorakai* (Myxosporidia: Myxozoa) to common carp *Cyprinus carpio* through the alternate oligochaete host. Syst. Parasitol. 36 : 79—84.

THE STUDY OF NON-ORGANIC SUBSTANCES CONTENT
IN *HENNEGUYA OVIPERDA* (COHN, 1895)
AND *MYXOBOLUS PSEUDODISPAR* (GORBUNOVA, 1936) MYXOSPORE VALVES

P. Yu. Tyutyayev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: Lythrum@mail.ru

The analysis of organic and non-organic substances in the valves of long stored in water *Henneguya oviperda* (Gohn, 1895) and *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936) myxospores has been made using the cytochemical methods and atomic-absorptional spectroscopy. The high content of Si (up to 94 %) and the presence of Ca, Mg, Fe, Mn cations (Cu, Al, Ni, Cr in fewer amounts) have been detected.

Key words: atomic-absorptional spectroscopy, elements, silicon, *Henneguya oviperda* (Cohn, 1895) and *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936).
