

## ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМНОГО АППАРАТА МИКСОСПОРИДИЙ (МУХОЗОА)

© П. Ю. Тютяев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: Pavel.tyutyayev@gmail.com

Малые размеры ядер и отсутствие данных о существовании конденсирующихся хромосом многие годы служили серьезными препятствиями на пути исследования кариологии миксоспоридий. Значительное усовершенствование методической базы современной биологии обеспечило новые подходы к изучению хроматина и хромосомного аппарата Мухозоа. При помощи конфокальной сканирующей микроскопии впервые удалось обнаружить и описать хромосомы в ядре генеративной клетки у *Zschokkela nova* (Клокасева, 1914). Кариотип составляют шесть хромосом (три пары). Две пары хромосом имеют продолговатую палочковидную форму. Хромосомы третьей пары имеют форму бумеранга (с перегибом посередине хромосомы и с утолщением на одном из концов). Длины хромосом: первая — 5 мкм, вторая — 4.8, третья — 3 мкм. Получена культура клеток плазмодия *Muxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936).

Ключевые слова: Мухозоа, хромосомы, культура клеток плазмодия, *Zschokkela nova* (Клокасева, 1914), *Muxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936).

С конца прошлого века в литературе идет оживленная дискуссия о филогенетических взаимоотношениях как между Мухозоа и Cnidaria, Bilateria и Cnidaria, а также между Мухозоа и Protozoa, к которым ранее относили этот таксон. Как было показано на примере многих групп животных, одна из проблем современной филогенетики — часто возникающие противоречия между реконструкциями, построенными по морфологическим и молекулярным признакам. Очевидно, в некоторых случаях причиной этих несовпадений является недостаточная объективность морфологических реконструкций, так как суждения о приоритетности гомологии или признака сохраняют элемент произвольности (Симпсон, 2006). Молекулярные реконструкции также не лишены некоторых недостатков (Hausdorf, 2000). Это обусловлено в первую очередь ограниченностью информативности любого гена, и при сравнении близких групп может не хватать изменчивых, информативных сайтов (Sørensen et al., 2000).

Проведено много генетических исследований миксоспоридий, получены и проанализированы последовательности многих генов. В то же время кариологические и цитологические данные являются обязательным компонентом построения филогенетической системы Мухозоа, однако этим вопросам уделяется гораздо меньше внимания. Таким образом, изучение организации хромосом и ядра миксоспоридий в целом является одним из актуальных вопросов в области биологии не только миксоспоридий, но и всех Metazoa.

Задача данной работы — изучение организации хромосомного аппарата миксоспоридий.

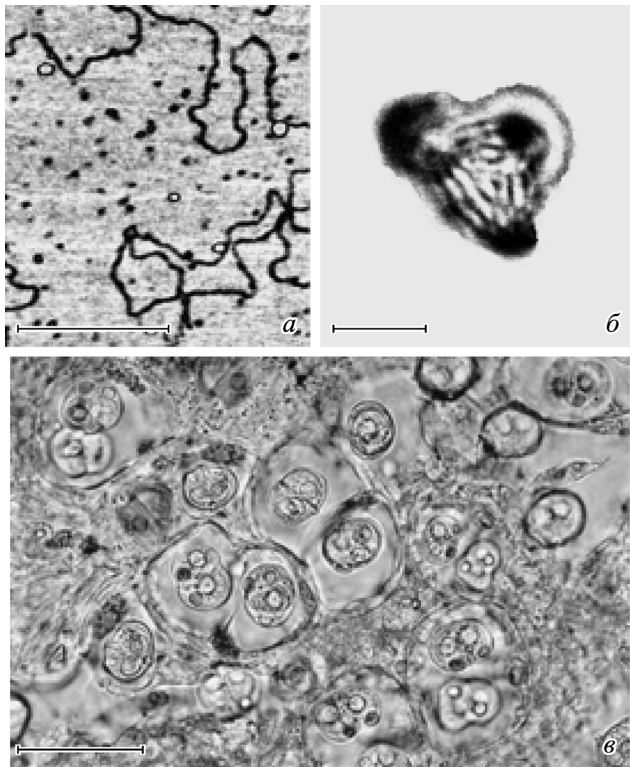
## Материал и методика

Исследование проводили на трех видах миксоспореиных плазмодиев на разных сроках развития. Плазмодии *Zschokkela nova* (Клокасева, 1914) изолировали из желчного пузыря карася *Carassius carassius* L., плазмодии *Muxidium gasterostei* (Noble, 1943) — из желчного пузыря колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. Живые плазмодии *Muxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936) выделяли из мышечной ткани плотвы *Rutilus rutilus* L.

Светооптическое исследование. Использовали готовые парафиновые срезы 2 мкм плазмодиев *Z. nova* и *M. gasterostei*, фиксированных в 4%-ном растворе формальдегида, затем обезвоженных и заключенных в парафин (Пирс, 1962). Эти материалы были любезно предоставлены А. В. Успенской (Институт цитологии РАН).

Для окрашивания ядер использовали красители: бромистый этидий (BD Biosciences, США), акридиновый оранжевый (ICN, Швейцария) и Хёхст 33342 (Sigma, США). Перед окрашиванием препараты депарафинировали и инкубировали в PBS в течение 20 мин. Затем препараты помещали на 20 мин в растворы красителей в PBS и потом тщательно промывали. При необходимости препараты докрасивали или, наоборот, отмывали. Были использованы более низкие концентрации веществ, чем общепринятые: для Хёхста 33342 и бромистого этидия — 0.03 мкг/мл, а для акридинового оранжевого — 0.09 мкг/мл. Для заключения окрашенных препаратов использовали среду Gel/Mount (Biomed. Corp., США). Препараты микроскопировали сразу после окрашивания. Окрашенные препараты изучали на конфокальных микроскопах Zeiss LSM и Leica TSC.

Приготовление проб для электронной микроскопии. Плазмодии, предварительно зафиксирован-



Организация хромосомного аппарата миксоспоридий.

*a* — хроматиновые фибриллы из ядер *Z. nova* (Клокасева, 1914); *б* — хромосомы *Z. nova* (Клокасева, 1914); *в* — культура клеток плазмодия *Mухobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936). Увел.: *a* — 10 000×; *б, в* — 1000×. Масштабные линейки: *a* — 0.01, *б* — 1.0, *в* — 1.5 мкм.

ные в 2%-ном растворе формальдегида (pH 7.4), тщательно отмывали и обрабатывали 0.01%-ным раствором проназы E в течение 30 мин для лизиса внеядерных белковых структур. Протеолиз блокировали добавлением раствора апротинина (1 мкг/мл) и центрифугировали суспензию. Затем к осадку на 30 мин добавляли 1%-ный раствор четырехоксида осмия. Тщательно отмывтый от избытка осмиевого фиксатора осадок подвергали окислению 2%-ным раствором перекиси водорода. После этого его окрашивали раствором красителя Хёхст 33342 (0.03 мкг/мл) и переносили на покровное стекло. Далее осадок контрастировали насыщенным водным раствором уранил-ацетата и цитрата свинца и тщательно отмывали (Гайер, 1974). На поверхность стекла наносили каплю 20%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина и высушивали до образования пленки. Пленки с элементами осадка переносили на сеточку с парлодиевым покрытием и изучали с помощью электронных микроскопов JEM-100С и JEM-100U.

Получение культуры плазмодиев клеток *M. pseudodispar*. Плазмодии *M. pseudodispar* извлекали из поперечнополосатых мышц плотвы *Rutilus rutilus*. Чтобы не допустить высыхания и тем самым повреждения трофозоида, ткань препарировали в среде Игла с добавлением среды 199. Плазмодии очищали от остатков мышечных волокон и переносили в чашки Петри со средой ДМЕМ для временного хранения. Материал промывали забуференным физиологическим раствором, не содержащим ионов Са и Mg (HEPES — 2.4 г, NaCl — 0.3 г, KCl — 0.5 г на 1 л тетрадиллированной стерильной воды), а далее суспендировали в растворе трипсин-версена. Диссоциацию клеток плазмодия контролировали микроско-

пически. К полученной клеточной суспензии добавляли инактивированную фетальную сыворотку плодов коровы (Hyclone, Германия) в количестве, равном добавленному раствору трипсин-версена, и центрифугировали при 400 g.

После отделения супернатанта клетки рассевали на покрытые коллагеном из рыбы покровные культуральные стекла (BD, США) из расчета 25 тыс. клеток на 1 см<sup>2</sup>, которые помещали в чашки Петри. В качестве среды культивирования использовали среду ДМЕМ (Биолот, Россия) с добавлением глутамина и экстракта из мышц плотвы. На 1 мл среды культивирования добавляли 10 мг лиофилизированного сухого экстракта. Клетки культивировали при 20 °С и составе газовой смеси 9 : 1 (CO<sub>2</sub> : O<sub>2</sub>). Все культуральные работы проводили в асептических условиях. Культивирование проходило без добавления антибиотиков. Количество жизнеспособных клеток в культуре определяли окрашиванием трипановым синим по стандартной методике (Seglen, 1976).

Приготовление экстракта из мышц плотвы. Мышцы плотвы измельчали ножницами и гомогенизировали до кашицеобразного состояния. Продукт разводили физиологической средой OR2 в соотношении 1 : 5 и инкубировали при 5 °С в течение 20 мин, часто перемешивая. Надосадочную жидкость сливали и центрифугировали. Деконтаминацию проводили с помощью фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтрат лиофилизировали и хранили при -80 °С.

## Результаты и обсуждение

Впервые при исследовании ядер генеративных клеток *Z. nova* были обнаружены хромосомы у миксоспоридий (см. рисунок, *б*). В плазмодиях *M. gasterostei* подобную картину обнаружить не удалось. Общее количество хромосом равняется шести (три пары). Хромосомы двух пар метацентрические, имеют продолговатую палочковидную форму. Хромосомы из третьей пары — субметацентрические, имеют форму бумеранга (с перегибом по середине тела хромосомы и с утолщением на одном из концов). Длины хромосом: первая пара — 5 мкм, вторая — 4.8, третья — 3 мкм. Также впервые удалось обнаружить расхождение хромосом в процессе внутриядерного митоза. При расхождении хромосомы расположены друг от друга на расстоянии не более 0.1 мкм. Электронно-микроскопическое исследование показало наличие нуклеосомных фибрилл в ядрах генеративных клеток *M. pseudodispar* (см. рисунок, *a*). Длина нуклеосомной фибриллы составляет 15 нм, диаметр — 3 нм. Большинство низших миксоспоридий, имеют от 3 до 8 пар мелких хромосом со средним размером около 0.3—0.7 млрд пар нуклеотидов (Cavalier-Smith, 1985). Часто их длина в митозе не превышает 2—3 мкм (Odorico, Miller, 1997). Данные о линейной неоднородности внутренних районов хромосом Cnidaria нам не известна. Таким образом, по размеру хромосомы Mухozoa и Cnidaria различаются незначительно. Но обнаруженные хромосомы существенно больше по размеру, чем хромосомы Placozoa и Prorifera (Traut et al., 2007).

Наибольшее количество плазмодиев *M. pseudodispar* было обнаружено в спинных мышцах. Молодые плазмодии имели сферическую форму диаметром до 1.8 мм, зрелые трофозои — веретенообразную форму (длина до

3.5 мм и ширина до 1.5 мм). В условиях культивирования выделенные клетки делились от 4 до 6 раз, формируя небольшую группу (см. рисунок, в). В культуре клетки располагаются группами от 5 до 20 клеток в каждой. Это согласуется с широко известным фактом, что у целого ряда низших Metazoa (Spongia, Placozoa и Cnidaria) наблюдается способность клеток диссоциированных тканей и даже целых организмов к агрегации (реагрегации) на основе цитотаксиса, ведущей к полной самосборке исходной организации тканей и организмов (Серавин, Гудков, 2005), т. е. возможно, что способность клеток плазмодиев миксоспоридий к контактному агрегативному поведению заложена в них генетически.

Клетки с прозрачной цитоплазмой имеют округлую форму, размер от 8 до 15 мкм, четко различимые ядра. Популяция клеток гетерогенна, в культуре происходят ряд последовательных делений и формирование панспорообласта, но миксоспора не образуется. Также практически нет клеток на терминальной стадии, предшествующей формированию миксоспоры. Возможно, это обусловлено сложным циклом развития миксоспориций, их паразитизмом или отсутствием специфических ростовых факторов. Через 3 нед культивирования происходила гибель 40 % клеток (окрашивание трипановым синим). Для дальнейшего изучения планируется получение стабильных линий миксоспориций. Процесс получения стабильной линии плазмодиев с высоким лимитом Хейфлика кажется нам маловероятным в связи с циклом развития миксоспориций. Для решения этой задачи требуется трансфицировать клетки. Наблюдение за культурой плазмодиев показало, что ее можно использовать для кариологического и цитологического изучения миксоспориций на стадии плазмодия.

Регресс характерен для многих паразитических форм, но даже среди этих форм степень регресса миксоспориций представляет собой явление из ряда выходящее. Например, миксоспориции многоклеточны в гаплоидной фазе жизненного цикла, которая у большинства животных одноклеточная, представленная гаметами и т. д. Открытия, сделанные в результате анализа генов рРНК, инициировали поиск других признаков многоклеточных у миксоспориций. Были обнаружены гены семейства *Hox*, которые у животных отвечают за развитие органов вдоль переднезадней оси зародыша. Функция этих генов у миксоспориций пока неясна (Canning, Okamura, 2004). По апоморфиям в спиралях 42 и 44 РНК стало возможным выделить этот таксон из Protista, но невозможно отличить от кишечнополостных. По апоморфии в шпильке E10-1 18SpРНК мы отличаем миксоспориций от кишечнополостных, но не от двусторонне-симметричных животных (Zrzavý et al., 1998).

Очевидно, что для углубленного эволюционного анализа требуется не только подробный кладистический анализ, но и цитологический и кариологический анализ миксоспориций. Полученные данные могут помочь в дальнейшем изучении кариологии и морфологии миксоспориций, а изучение организации хроматина делает возможным дальнейшие углубленные генетические исследования.

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

#### Список литературы

- Гайер Г. 1974. Электронная гистохимия. М.: Мир. 238—361.
- Пирс Э. 1962. Теоретическая и прикладная гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 962 с.
- Серавин Л. Н., Гудков А. В. 2005. Амебоидные свойства клеток в процессе раннего морфогенеза и природа возможного протозойного предка Мухозоа. Журн. общ. биол. 66 : 212—223.
- Симпсон Дж. Г. 2006. Принципы таксономии животных. Пер. с англ. М.: Товарищество научных изданий КМК. 293 с.
- Canning E. U., Okamura B. 2004. Biodiversity and evolution of the Myxozoa. Adv. Parasitol. 56 : 431—441.
- Cavalier-Smith T. 1985. Eukaryote gene numbers, non-coding DNA and genome size. In: The evolution of genome size. T. Cavalier-Smith (ed.). Chichester et al.: John Wiley & Sons Ltd. 69—103.
- Hausdorf B. 2000. Early evolution of the Bilateria. Syst. Biol. 49 : 130—142.
- Odorico D. M., Miller D. J. 1997. Internal and external relationships of the Cnidaria: implications of primary and predicted secondary structure of the 5'-end of the 23S-like rDNA. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. 264 : 77—82.
- Rando O. J., Ahmad K. 2007. Rules and regulation in the primary structure of chromatin. Curr. Opin. Cell Biol. 19 : 250—256.
- Seglen P. O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. Meth. Cell Biol. 13 : 29—83.
- Sørensen M. V., Funch P., Willerslev E. et al. 2000. On the phylogeny of Metazoa in the light of Cyclophora and Micrognathozoa. Zool. Anz. 239 : 297—318.
- Traut W., Szczepanowski M., Vítková M. et al. 2007. The telomere repeat motif of basal Metazoa. Chromosome Res. 15 : 371—382.
- Zrzavý J., Mihulka S., Kepka P. et al. 1998. Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. Cladistics. 14 : 249—285.

Поступила 22 X 2007

#### ORGANIZATION OF THE CHROMOSOMAL APPARATUS MYXOZOA

P. Yu. Tyutyayev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: Pavel.tyutyayev@gmail.com

For a long period of time two factors have impeded investigations of myxosporidia physiology: the small size of their nuclei and the absence of data about existence of condensed chromosomes in these organisms. Significant progress in biological research methods provides new approaches to investigations of Myxozoa chromatin and chromosomal apparatus. Using confocal scanning microscopy chromosomes in the generative cell nuclei

of *Zschokkela nova* (Klokacewa, 1914) were revealed and described in this work for the first time. It has been shown that their karyotype consists of six chromosomes (three pairs). Two pairs of chromosomes have an oblong rod-shaped form. Chromosomes of the third pair have a boomerang form (with a bend in the middle of the chromosomes body and with a thickening on one of the ends). Lengths of chromosomes: 5  $\mu\text{m}$  (1st pair), 4.8  $\mu\text{m}$  (2nd pair) and 3  $\mu\text{m}$  (3rd pair). The culture of plasmodium cells *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936) was received.

Key words: Myxozoa, chromosomes, culture of plasmodium cells, *Zschokkela nova* (Klokacewa, 1914), *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936).