

ПРИМЕНЕНИЕ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ ЯДЕР ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МУХОЗОА

© П. Ю. Тютяев

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

С помощью конфокальной микроскопии проведен анализ ядер плазмодиев и спор, f-актина и α - и γ -тубулина трех видов микоспоридий — *Zschokkela nova* (Klokacewa, 1914), *Myxidium gasterostei* (Noble, 1943) и *Muxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936). Обнаружены особенности строения ядер и изменения их структуры в процессе деления при образовании микоспоры.

Ключевые слова: плазмодий, споры, f-актин, α - и γ -тубулин, *Zschokkela nova* (Klokacewa, 1914), *Myxidium gasterostei* (Noble, 1943), *Muxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936).

Для решения разнообразных биологических задач исследователи все чаще обращаются к изучению строения и структуры хроматина. Одним из современных и доступных методов является сканирующая конфокальная микроскопия.

Исследования ядер и хромосомных территорий, в том числе и микоспоридий, могут принести неоценимую пользу (например, при изучении цикла развития этих поистине удивительных паразитов). Как и все эукариоты, микоспоридии имеют обособленные ядра, отделенные от цитоплазмы двойной мембраной. Организация хромосомного аппарата у низших и высших эукариот может существенно различаться. В частности, среди простейших отмечены виды, хромосомы которых слабо конденсированы не только в интерфазе, но и в митозе (Raikov, 1982; Скарлато и др., 1998). В связи с этим целесообразно уделить особо пристальное внимание изучению структуры ядра, состоянию хроматина, выявлению хромосом и другим вопросам, непосредственно связанным с ядерным аппаратом микоспоридий. При этом я столкнулся с целым рядом проблем, затрудняющих процесс изучения ядер. К ним можно отнести небольшой (1 мкм) размер ядер и особенности строения микоспоры и плазмодия.

Как нами было показано ранее, в состав оболочки микоспоры входит до 94 % кремния, что придает ей и споре в целом ряд свойств, которые негативно влияют на точность результатов определений (Туутуаев, 2006). Кремний сообщает споре повышенную устойчивость к колебаниям физических факторов, таких как температура, уровень pH среды и т. д. Многие современные методы в качестве аналитического сигнала используют излучение в разных диапазонах спектра, в том числе флуоресценцию. Методы количественного определения ДНК также не являются исключением. Кремний, содержащийся в оболочке микоспоры, придает ей ряд свойств, существенно влияющих на процесс исследования и, в частности, на точность измерений. К этим свойствам относятся особенная герметичность споры, повышенная отражающая спо-

собность, свойство поляризовать проходящий свет, изменять его плоскость поляризации и рассеивать световой пучок. Первое свойство играет важную роль при исследовании ДНК как светооптическими методами (микроскопия, проточная цитофлуориметрия, FISH и т. д.), так и методами, основанными на экстракции ДНК (электрофорез, блоттинг и т. д.). Оптические особенности кремневой оболочки споры оказывают значительное влияние на процесс детекции и количественной обработки сигнала в различных видах микроскопии (Slavik, 1996). Задача настоящей работы — выяснить, возможно ли использовать конфокальную микроскопию при кариологическом исследовании микоспоридий.

Материал и методика

Были отобраны плазмодии двух видов микоспоридий: плазмодий *Zschokkela nova* (Klokacewa, 1914), изолированные из желчного пузыря карася *Carassius carassius* L. на разных сроках развития; *Myxidium gasterostei* (Noble, 1943) из желчного пузыря колюшки *Gasterosteus aculeatus* L.; жизнеспособные споры *Muxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936), выделенные из мышечной ткани плотвы *Rutilus rutilus* L.

Для исследования использовали готовые парафиновые срезы 2 мкм плазмодиев указанных видов, 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 после тщательно промывали. При необходимости препараты докрашивали или, наоборот, отмывали. Были испо-

льзованы 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 (Biomedica Corp., США). Препараты микроскопировали сразу после окрашивания.

Живые споры *M. pseudodispar* изолировали из попеременнополосатых мышц плотвы и тщательно очищали. Для исследования устойчивости ядра к изменению температуры споры постепенно охлаждали в течение 1 сут до $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и без фиксации окрашивали раствором бромистого этидия в той же концентрации. Для выявления актиновых и тубулиновых филаментов объекты фиксировали в ацетоне. Для визуализации фибриллярного актина препараты окрашивали родамин-фаллоидином, для обнаружения α - и γ -тубулина применяли непрямую иммуноцитофлуориметрию с использованием мышиных моноклональных антител (Molecular Probes, США) к α - и γ -тубулину и антител, меченных флуорохромом Alexa 488 по стандартной методике (Uspenskaya, Raikova, 2004). Окрашенные препараты изучали на конфокальных микроскопах Zeiss LSM и Leica TSC и имиджинговой конфокальной системе BD CARV 2™ Confocal Imager. Количественное определение проводили с использованием программ Huygens PM и Setmax BD с предварительной деконволюцией.

Результаты и обсуждение

По мнению большинства специалистов, в плазмодиях микроспоридий присутствуют два типа «пузыревидных» ядер, различающихся по плотности, форме и размерам. Генеративные ядра обычно мельче вегетативных и имеют

шаровидную форму; они участвуют в формировании споробластов и панспоробластов, в которых формируются споры. Еще Грассе (Grassé, 1960) отметил, что эти ядра правильнее называть генеративными клетками, так как они окружены цитоплазмой. Вегетативные ядра регулируют трофические функции. Часто спорообразованию микоспоридий предшествует вегетативное размножение, когда происходит увеличение количества плазмодиев путем плазмотомии. При этом деление цитоплазмы клеток незначительно отстает от деления вегетативных ядер генеративных клеток. Вегетативное размножение может происходить также путем наружного и внутреннего почкования (Debaisieux, 1925; Shulman, 1966; Booker, Curent, 1981; Исков, 1989).

Помимо вегетативного размножения путем плазмотомии и почкования трофозоида (плазмодия) для микоспоридий характерно и бесполое размножение, связанное со спорообразованием (Uspenskaya, 1982; Успенская, 1984). В результате в зависимости от величины плазмодия формируются 1—2 млн спор. Процесс спорообразования в крупных многоядерных плазмодиях начинается с появления в его эндоплазме двухклеточных образований, организованных по принципу «клетка в клетке», — панспоробластов. Возникает панспоробласт из генеративных клеток путем эндоцитокинеза (Успенская, Райкова, 2001). Ядро генеративной клетки делится митотически на два, и вокруг одного из них (генеративного ядра) обособляется участок цитоплазмы путем слияния пузырьков эндоплазматической сети и образования мембраны. Наружная клетка панспоробласта (перидит) содержит вегетативное ядро, а внутренняя спорогенная клетка, или споробласт, — генеративное ядро. Часто в панспоробласте образуются два споробласта путем деления спорогенной клет-

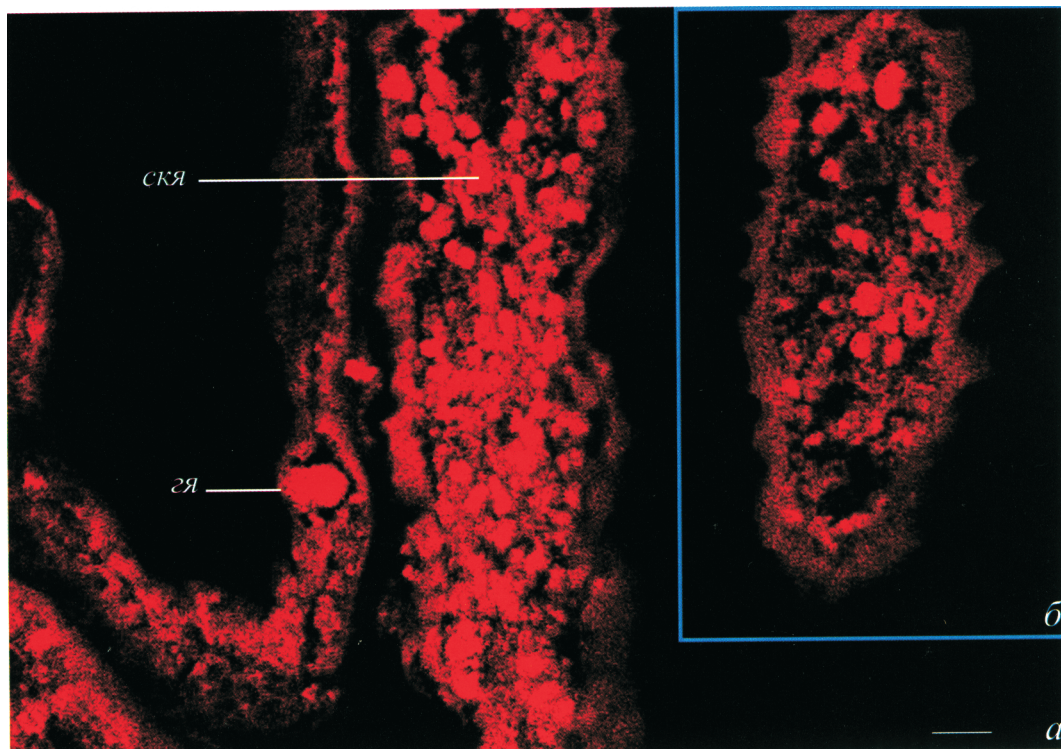


Рис. 1. Локализация ядер в плазмодии *Myxidium gasterostei* (Noble, 1943) при окраске бромистым этидием.

a — скопление генеративных клеток и вегетативных ядер; *б* — группа ядер в цитоплазме плазмодия. *скя* — скопление ядер, *гя* — генеративное ядро. Масштабный отрезок — 1 мкм.

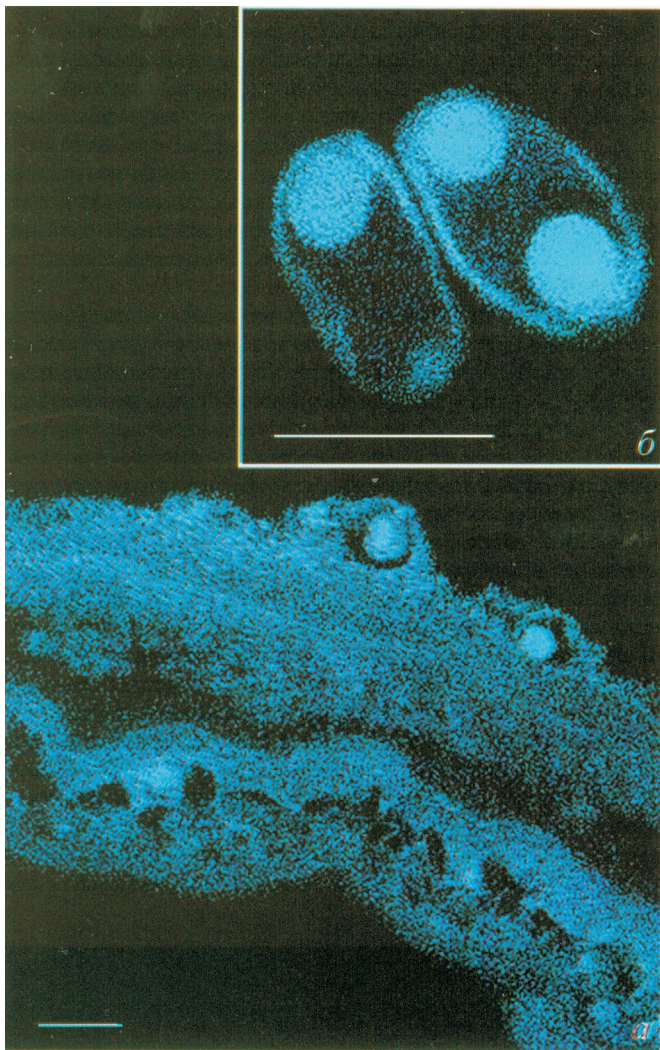


Рис. 2. Плазмодий *Zschokkela nova* (Клокасева, 1914).

a — генеративные клетки на поверхности плазмодия; *б* — стрекательные капсулы. Окраска акридиновым оранжевым. Масштабные отрезки: *a* — 10, *б* — 5 мкм.

ки на две, и тогда это — двухспоровый панспоробласт. В нем образуется по две споры. Путем последовательных митотических делений споробласта возникают клетки, слагающие споры. Первоначально все вновь образовавшиеся клетки однородны и находятся внутри перецита. Впоследствии происходят дифференциация клеток и их группировка в количестве, определенном для каждого вида микроспоридий. Из каждой группы клеток формируется многоклеточная спора со всеми ее элементами — створками, полярной капсулой и амeboидным зародышем (спороплазмой). Ядра амeboидных зародышей более компакты, чем ядра плазмодиев и споробластов, и имеют крупное ядрышко, в котором содержатся гранулярный и фибриллярный компоненты (Успенская, 1984).

Предполагается, что жизненный цикл микроспоридий включает в себя вегетативное размножение, бесполое размножение и половой процесс (Успенская, 1984). Половой процесс в микроспорейной фазе цикла был описан как гипотетический в ряде монографий (Shulman, 1966; Uspenskaya, 1982; Успенская, 1984). Очевидно, для существования полового процесса необходимо мейотическое деление ядер панспоробластов. В результате мейоза ядер

панспоробласта образовывались гаплоидные ядра амeboидного зародыша. Считалось, что половой процесс может быть аутогамным или педогамным; ядра сливаясь, образуют синкарион (Шульман, 1959). К сожалению, до сих пор мы не располагаем достоверными сообщениями о наблюдении мейоза в ядрах спорогенных клеток. Под электронным микроскопом картина, напоминающая мейоз, встретила единственный раз только в панспоробласте *Muxidium gasterostei* (Успенская, 1984); описаны синаптомные комплексы в скоплении клеток в плазмодии (Siau, 1977).

В плазмодиях *M. gasterostei* на разных стадиях развития с помощью конфокальной микроскопии нами были обнаружены скопления ядер, часто локализованные в образованиях продолговатой формы, у границы с альвеолярным слоем. Ядра имеют размеры от 1 до 5 мкм. В одном образовании порой можно насчитать до 50 ядер (рис. 1). На ранних сроках инвазии генеративные ядра *Z. nova* диаметром до 9 мкм локализованы в генеративных клетках, которые одиночно располагаются на поверхности плазмодия (рис. 2, *a*). Следует отметить повышенную способность плазмодиев микроспоридий адсорбировать на своей поверхности различные химические молекулы. Речь идет о таких низкомолекулярных соединениях, как флуоресцентные красители, и таких высокомолекулярных веществах, как антитела и их комплексы с флуорохромами и ферментами. Особенно высоким средством обладает альвеолярный слой плазмодия. Это обстоятельство может послужить дополнительным источником ошибок. Поэтому мы использовали низкие разведения красителей и антител с последующей тщательной отмывкой образца. Также клетки трофозоитов содержат много

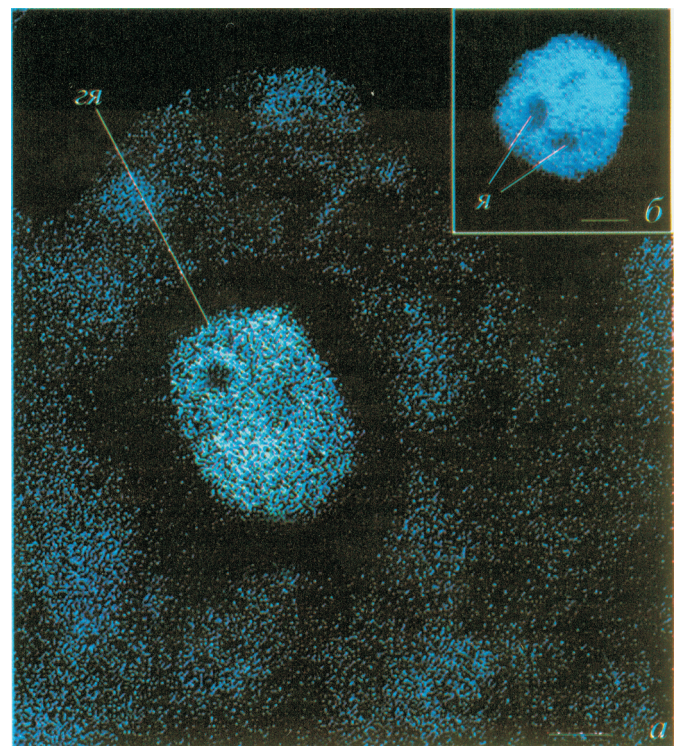


Рис. 3. Генеративная клетка плазмодия *Zschokkela nova* (Клокасева, 1914).

a — генеративная клетка; *б* — генеративное ядро с двумя нуклеолами. *гя* — генеративное ядро с нуклеолой, *я* — две нуклеолы. Масштабные отрезки — 1 мкм.

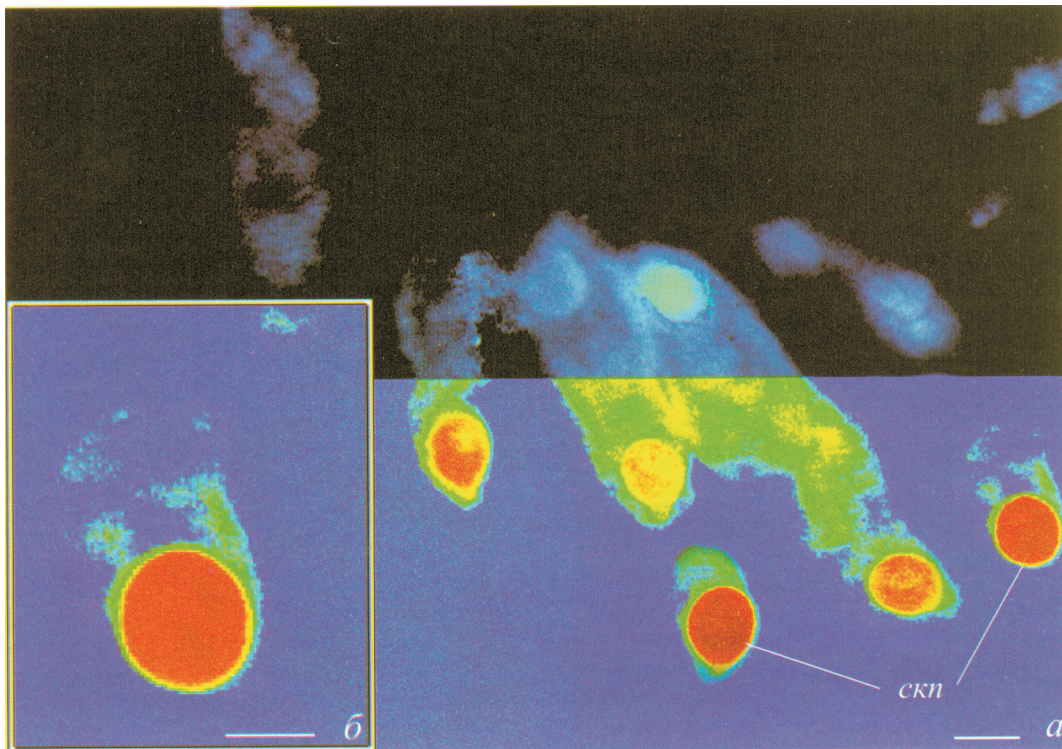


Рис. 4. Стрекательные капсулы *Zschokkella nova* (Клокасева, 1914) при окраске Хёхстом 33342.

a — группа спор; *б* — полярная стрекательная капсула. *скп* — стрекательные капсулы. Использована функция конфокального микроскопа Rainbow для подчеркивания отсутствия структуры содержимого стрекательной капсулы. Масштабные отрезки — 1 мкм.

митохондрий, окрашенная ДНК которых создает дополнительные трудности при микроскопическом исследовании.

При исследовании активных филаментов у миксоспоридий мы обнаружили их в самом плазмодии, а также в зрелых спорах в стрекательной нити, как это уже отмечали ранее (Успенская, 1988; Uspenskaya, Raikova, 2004). При исследовании плазмодиев *Z. nova* было обнаружено несколько видов ядер, различающихся по размеру и форме, а также по локализации ядрышек. Наиболее крупные ядра присутствуют в генеративных клетках. Эти клетки на ранних стадиях сферические, с крупным (до 9 мкм) ядром, имеющим круглую форму. В середине ядра расположены два ядрышка. Встречаются ядра яйцевидной формы, их длина увеличивается до 11—13 мкм, а ядрышки мигрируют к поверхности ядра (рис. 3). Встречаются розеткообразные клетки, имеющие от 5 до 8 лучей. В одном из лучей расположено яйцевидное генеративное ядро, в других, вероятно, — дочерние ядра меньших размеров.

Мухозоа в составе спор имеют довольно крупные стрекательные капсулы. При обработке препарата в них концентрируется избыток красителей, тропных к ДНК, что может неверно трактоваться как ядерные образования. Такую картину легко обнаружить в спорах *Z. nova* (рис. 2, б; 4). Часто в ядре *Z. nova* можно наблюдать до трех пар цилиндрических участков суперспирализованного хроматина длиной до 0,3 мкм. При подготовке к делению ядро увеличивается в размере примерно в 2 раза, что, вероятно, может быть объяснено дубликацией генетического материала. Хроматин уплотняется и отдалается от ядерной мембраны, и внутри органоида можно наблюдать от 2 до 4 участков прикрепления хроматина к ядерной мембране. В результате этого ядро приобретает своеобразную

сетчатую структуру. В ядре формируются плотные участки, которые в дальнейшем дают начало дочерним ядрам. Во время всего процесса деления материнское ядро остается прикрепленным к клеточной мембране двумя тяжами из микротрубочек. Природу белка, составляющего микротрубочки, определить не удалось. Дочерние ядра отделяются от материнского ядра, формируя выпячивание в ядерной мембране. В процессе отделения дочерние ядра приобретают сначала продолговатую форму длиной до 0,2 мкм, а затем сферическую диаметром до 0,4 мкм. В центре молодого ядра располагаются участки гиперспирализованного хроматина. Непосредственно после образования дочерних ядер они в свою очередь могут начинать делиться. В результате последовательных делений на стадии формирования микоспоры ядра располагаются в клетке в виде креста.

Дополнительную сложность в изучении ядер в жизнеспособных микоспорах придает их крайняя неустойчивость к изменению температур, изученная нами на примере живых спор *M. pseudodispar*. При перепаде температур ядро в живой споре не сохраняет своей целостности и его содержимое изливается в окружающее цитоплазматическое пространство. В состав ядер плазмодия входят эухроматин и гетерохроматин. Особенно много гетерохроматина в яйцевидных ядрах в момент деления. Но говорить о выявлении хромосом и хромосомных структур пока нельзя. При послойном сканировании и построении 3D-модели отчетливо виден гетерохроматин в большинстве ядер плазмодия *Z. nova*. Использование трех красителей, тропных к разным парам нуклеотидов ДНК, не позволило выявить какие-либо особенности организации хроматина. К сожалению, нам не удалось получить четкую картину локализации α - и γ -тубулина.

Несмотря на долгий период изучения (порядка 100 лет), на сегодняшний день физиология и цитология микоспоридий изучены намного меньше, чем, например, представителей типа Kinetoplastida или Ciliata. Это вполне может быть связано с дефицитом информации о строении ядра, и, как нам кажется, именно поэтому место микоспоридий в системе Metazoa и их филогенетические связи с другими группами неясны. Применение конфокальной микроскопии в изучении микоспоридий оказалось полностью оправданным. Главными преимуществами данного метода являются: перед флуоресцентной микроскопией — большое разрешение, а перед электронной микроскопией — возможность послойного глубинного сканирования образца без приготовления ультратонких срезов, во время которого часть материала неизбежно теряется. Эти обстоятельства позволяют вывести исследования ядерного аппарата микоспоридий на качественно новый более высокий уровень.

Автор выражает сердечную благодарность А. В. Успенской за предоставление материала в виде парафиновых срезов и за ценные советы во время проведения работы.

Список литературы

- Исков И. В. 1989. Микоспоридии (Myxosporidia) фауны Украины. Споровики, кнidosпоридии, микоспоридии. Т. 37, вып. 6. Киев: Биоинфо. 210 с.
- Пирс Э. 1962. Теоретическая и прикладная гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 962 с.
- Скарлато С. О., Сомова Н. В., Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н., Бобылева Н. Н., Фролов А. О. 1998. Особенности организации хромосомного аппарата жгутиконосцев Crithidia sp. Цитология. 40 (11): 991—1005.
- Успенская А. В. 1984. Цитология микоспоридий. Л.: Наука. 112 с.
- Успенская А. В. 1988. О роли кальция и цитоскелета в механизме действия стрекательного аппарата спор микоспоридий. Цитология. 30 (8): 970—975.
- Успенская А. В., Райкова Е. В. 2001. Цитологические аспекты сходства и различия микоспоридий и книдарий. Цитология. 43 (3): 284—309.
- Шульман С. С. 1959. Основные направления эволюции в отряде Myxosporidia. Зоол. журн. 3: 1481—1497.
- Booker O. J., Curent W. L. 1981. Myxobilatus microspora (Kudo, 1920) (Myxozoa: Myxosporidia) in the largemouth bass (*Micropterus salmoides* Lacepede): plasmodium, morphology and fine structure. J. Parasitol. 67: 859—865.
- Debaisieux P. 1925. Les Myxidium giardi at le *Sinoulinea gibsoni*, deux Myxosporidioses de l'Anguillae. Ann. Soc. Sci. 44: 374—379.
- Grassé P. P. 1960. Les myxosporidies sont des organismes pluricellulaires. C. R. Acad. Sci. Paris. 251: 2638—2640.
- Raikov I. B. 1982. The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Wien; New York: Springer-Verlag. 474 p.
- Shulman S. S. 1966. Evolution and phylogeny of Myxosporidia. In: Proceedings of the First International Congress of Parasitology. Roma. 447—448.
- Siau Y. 1977. Observation en microscopie électronique du complex synaptonématique chez des myxosporidies. C. r. Acad. Sci. D. 288: 403—404.
- Slavik J. 1996. Fluorescence microscopy and fluorescent probes. New York; London: Plenum Press. 306 p.
- Tyutyayev P. Yu. 2006. The research of chemical compound of *Henneguya oviperda* (Cohn, 1895) (Myxozoa) spores. In: Abstract book of annual symposium «Silicon Reseach». Madrid. 23—25.
- Успенская А. В. 1982. New data on the live cycle and biology of Myxosporidia. Arch. Protistenk. 126: 309—338.
- Успенская А. В., Райкова О. И. 2004. F-актин и β -тубулин локализация в микоспоре жалящем аппарате *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936 (Myxozoa, Myxosporidia). Цитология. 46 (8): 748—754.

Поступила 20 IX 2007

THE APPLICATION OF CONFOCAL SCANNING MICROSCOPY TO STUDY MIXOZOA NUCLEI

P. Yu. Tyutyayev

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

The analysis of plasmodium and spore nuclei, f-actin, α - and γ -tubulin of three *Mixosporidia* species — *Zschokkela nova* (Klokacewa, 1914), *Myxidium gasterostei* (Noble, 1943) and *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936) — was performed using confocal microscopy. We have found out the features of nucleus structure and its changes during division and formation of myxospores.

Key words: plasmodium, spore nuclei, f-actin, α - and γ -tubulin, *Zschokkela nova* (Klokacewa, 1914), *Myxidium gasterostei* (Noble, 1943), *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936).