

УЛЬТРАТОНКОЕ СТРОЕНИЕ ТАК НАЗЫВАЕМЫХ ЦИСТ
НЕКОТОРЫХ ВИДОВ МИКСОСПОРИДИЙ

А. В. Успенская

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

Изучено ультратонкое строение вегетативных стадий миксоспоридий, обозначаемых как «циста». Установлено, что это крупные плазмодии, а не цисты, строение поверхности которых зависит от биологии паразита.

За вегетативными стадиями многих тканевых и внутриклеточных миксоспоридий прочно закрепилось название «циста». Так они до сих пор обозначаются в определителях и при описании этих видов. Однако в исследованиях под световым микроскопом уже было установлено, что многие из них не являются цистами в строгом смысле этого термина и, во всяком случае, не имеют ничего общего с цистами покоя или размножения простейших (Шульман, 1966; Гинецкая, Добровольский, 1978).

Часто это крупные шаровидные или овальные плазмодии, которые не выделяют никаких оболочек, но благодаря их белому или желтоватому цвету они резко выделяются на фоне органов или тканей хозяина, отчего возникает сходство с цистой (Шульман, 1966). Иногда впечатление дополнительных оболочек создается плотно прилегающими к плазмодию стенками сосудов или желчных протоков (Davis, 1923; Шульман, 1966). В ряде случаев элементы тканей хозяина (мышечные волокна, коллагеновые волокна, соединительная ткань, эпителиальные клетки) образуют вокруг паразита более или менее толстые оболочки (Шульман, 1966). Иногда возникает сложная капсула из соединительной ткани хозяина или пролиферирующих эпителиальных клеток, пронизанная сосудами. В этих случаях вегетативные стадии действительно принимают облик цисты (Schröder, 1906; Nemeček, 1911; Kudo, 1916; Plehn, 1925; Заварзин, 1938; Шульман, 1966; Schubert, 1968).

Таким образом, в результате исследований под световым микроскопом содалось впечатление, что паразит не выделяет дополнительных оболочек и имеет одну мембрану, а все дополнительные оболочки — это производное тканей хозяина (Шульман, 1966).

В работах, проведенных на электронно-микроскопическом уровне (Lom, Puytorac, 1965; Schubert, 1968; Current, Janovy, 1976, 1978; Current, 1979; Desser, Paterson, 1978; Current a. o., 1979), о наружной мембране миксоспоридий приводятся более разноречивые данные. В одних работах описывается единственная мембрана (Lom, Puytorac, 1965; Успенская, 1969, 1979; Current, 1979; Schubert, 1968), в других говорится о двойной мембране или о двух мембраноподобных слоях (Lom, Puytorac, 1965; Desser, Paterson, 1978), в третьих сообщается о существовании гранулярного или в виде частотола слоя, выделяемого паразитом поверх двойной или ординарной мембраны и отделяющего паразита от тканей хозяина, или даже сообщается о синцитиальной стенке, ограниченной двумя мембранами (Current, Janovy, 1976, 1978; Current a. o., 1979; Desser, Paterson, 1978).

В настоящей работе приводятся сведения об ультратонком строении вегетативных стадий миксоспоридий, обозначаемых в определителях как циста;

а именно: *Kudoa quadratum* (Thelohan, 1895) из мышечных волокон *Muscorpius*; *Myxobolus disparoides* (Schulman, 1962) из жабр маринки *Schizothorax intermedius*; *Henneguya oviperda* (Cohn, 1895) из икринки щуки *Esox lucius*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Материал собирали в разных экспедициях: на Восточном Памире, на Белом море и на оз. Врево Ленинградской обл. Основными фиксаторами были фиксатор Палада и четырехокись осмия на какодилатном буфере. Фиксации после обезвоживания заливали в аралдит и эпон. Срезы приготавливали на ультратоме LKB, контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом, а затем изучали под электронным микроскопом Tesla-600, Jem-7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Kudoa quadratum. Vegetативные стадии *K. quadratum* паразитируют в мышечных волокнах бычка *Myxoscephalus scorpius*, таким образом, их можно приравнять к внутриклеточным паразитам. Vegetативные стадии, называемые цистами, на самом деле представляют собой довольно крупных (в нашем материале до $0,3 \times 2$ мм) веретеновидных плазмодиев, поверхность которых ограничена одной элементарной мембраной, образующей тупоконечные и короткие микроворсинки, особенно выраженные у молодых особей (рис. 1, 1; см. вкл.). По мере роста плазмодий заполняет мышечную клетку и его поверхность близко прилегает к мембране мышечного волокна, что создает впечатление наличия дополнительной оболочки у плазмодия. Однако под электронным микроскопом обычно между двумя этими оболочками можно видеть остатки неполностью лизированных под влиянием ферментов паразита протофибрилл мышечного волокна (рис. 1, 3).

Кнутри от наружной мембраны плазмодия располагается плотный слой цитоплазмы с пиноцитозными вакуолями, свободными рибосомами. Далее вглубь следует зона, богатая вакуолями с различными включениями и митохондриями, с продолговатыми и многочисленными кристами. Еще глубже располагаются генеративные клетки и стадии спорогенеза, а также вегетативные ядра плазмодия. В каждом споробласте у этого вида образуется по одной споре. Эта часть цитоплазмы, особенно по мере дифференцировки спор, сильно вакуолизируется, и формирующиеся споры лежат внутри крупных вакуолей (рис. 1, 2). Споры этого вида имеют по 4 стрекательных капсулы и по 4 створки. В связи с этим в споробласте в результате деления возникает 9 спорообразующих клеток. Генеративные клетки и клетки споробластов имеют гораздо более плотную цитоплазму, чем окружающая их цитоплазма плазмодия (рис. 1, 2), благодаря чему под световым микроскопом они резко выделяются на фоне последней. Видимо, поэтому они принимались за мелких плазмодиев, находящихся внутри цисты (Шульман, 1978; Ковалева, Шульман, 1978) или капсулы.

В каждом мышечном волокне мы встречали лишь по одному крупному плазмодию. Плазмодии всегда находятся внутри оболочки волокна. Видимо, весь цикл трофозойта *K. quadratum* протекает, вплоть до завершения спорообразования, внутри одного мышечного волокна хозяина. Лишь после дезинтеграции самого плазмодия, набитого зрелыми спорами, разрушается оболочка мышечного волокна, миофибриллы которого были лизированы паразитом, и по существу от волокна осталась лишь одна мембрана, прилегающая к паразиту. После этого зрелые споры можно наблюдать и в межклеточном пространстве.

Из наших данных ясно, что наличие мелких плазмодиев у представителей *Kudoa* — не обязательный признак рода, а наличие мелких (не более чем с 8 споробластами) вегетативных стадий не может считаться признаком отряда *Multivalvulea*, как считает Шульман и соавторы (Шульман, 1978; Ковалева, Шульман, 1978).

В случае, если плазмодии не достигли слишком крупных размеров и не оказывают физического давления на соседнюю ткань, волокна, прилегающие к зараженному, кажутся нормальными (рис. 1, 3). Лизиса мышечной ткани, считающегося характерным результатом паразитирования *Multivalvulea* (Ковалева, Шульман, 1978), ни прижизненно, ни после гибели бычков (при содер-

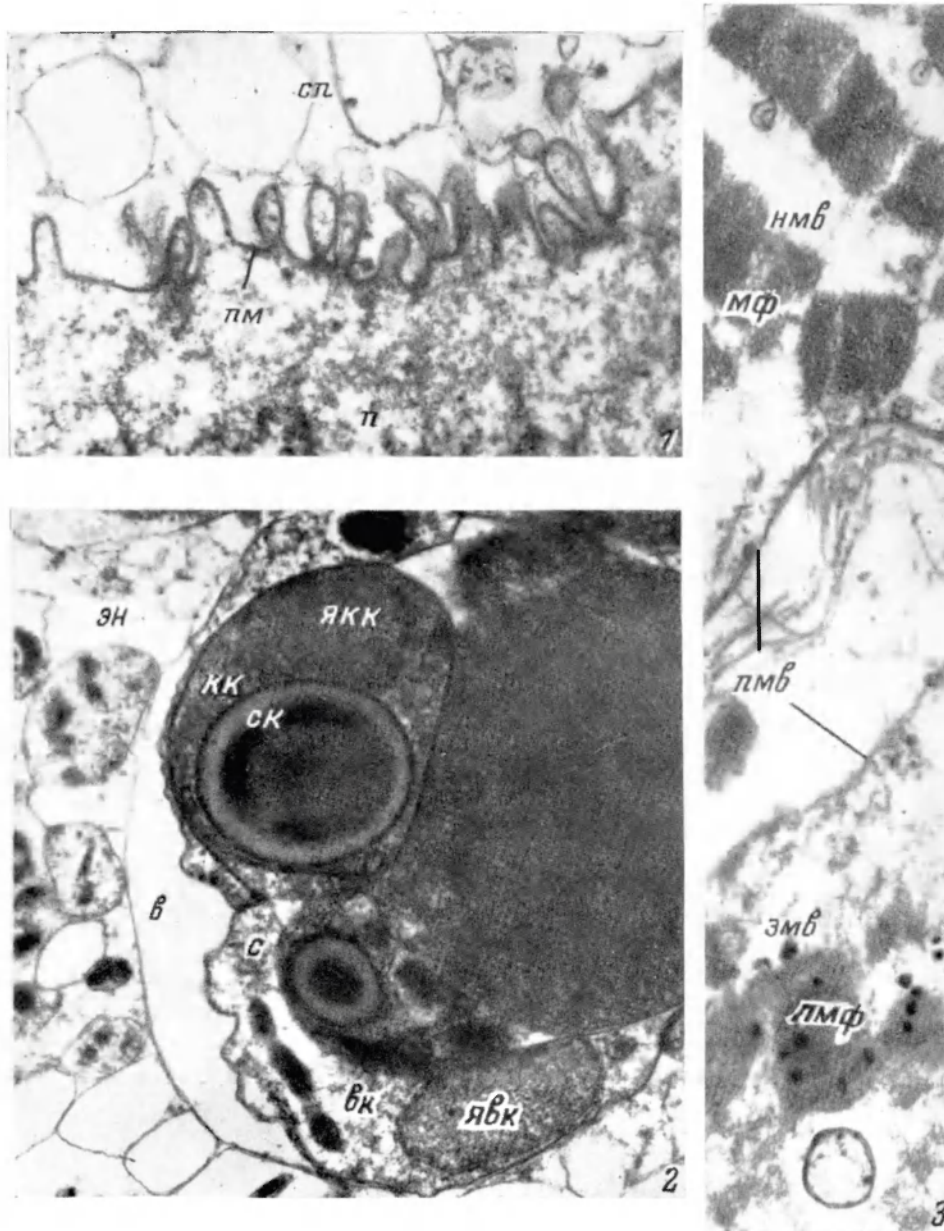


Рис. 1.

1 — строение поверхности плазмодия *Kudoa quadratum*; 2 — развитие споры у *Kudoa quadratum*; 3 — зараженное *Kudoa* и соседнее незараженное мышечное волокно бычка. п — плазмодий; пм — плазматическая мембрана плазмодия; сп — саркоплазма мышечного волокна; с — споробласт с развивающейся спорой; в — вакуоль; кк — капсулогенная клетка; якк — ядро капсулогенной клетки; ск — стрекательная капсула; вк — вальвогенная клетка; явк — ядро вальвогенной клетки; эп — эндоплазма плазмодия; пме — плазмолемма; эмв — зараженное мышечное волокно; нмв — незараженное мышечное волокно; мф — миофибриллы; лмф — лизированные миофибриллы.

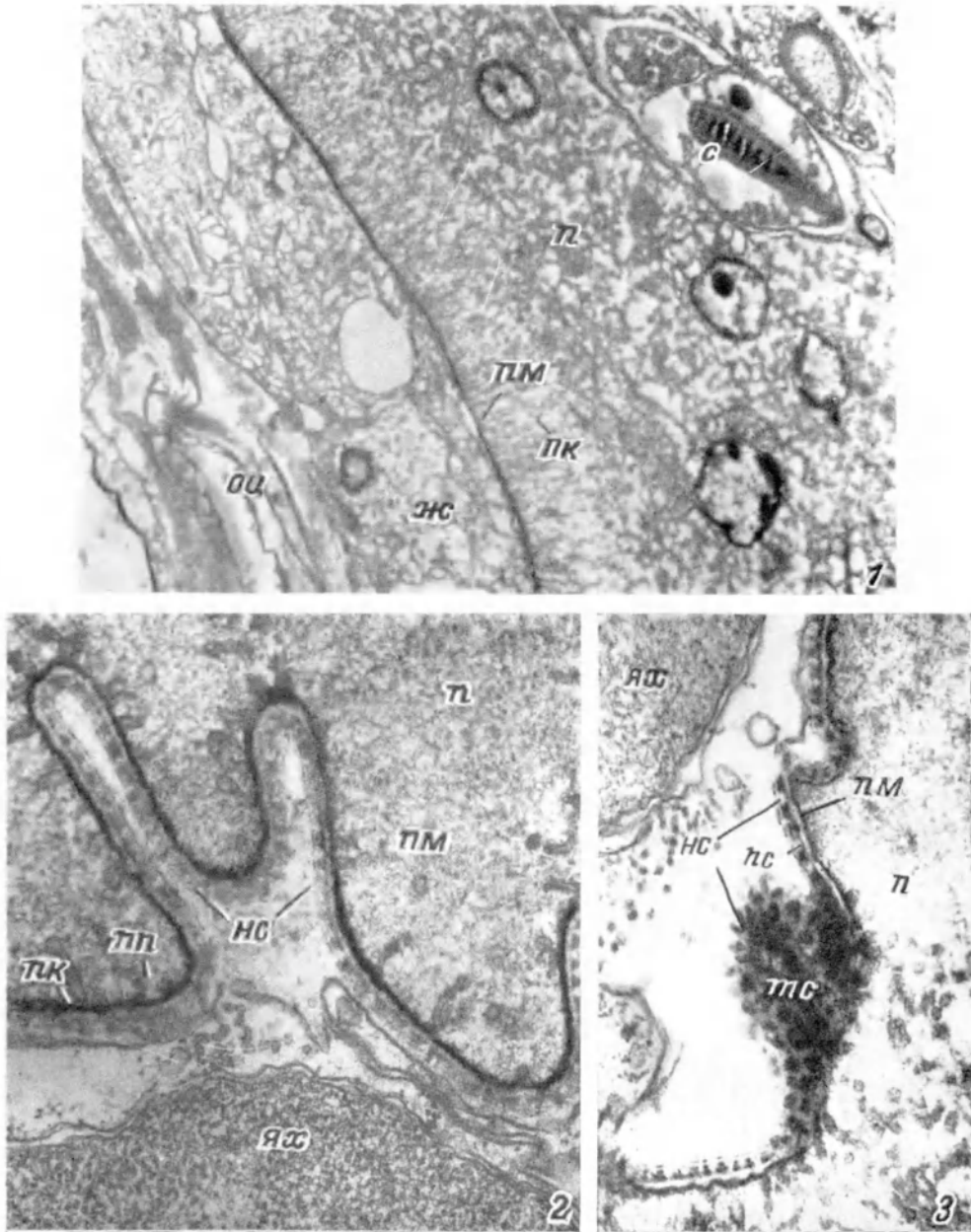


Рис. 2.

1 — плазмодий *Heneguya oviparum* внутри икринки *Esox lucius*; 2, 3 — ультратонкое строение поверхности плазмодия *Mухоболus disparoides*. *ou* — оболочки икринки; *жс* — глыбки желтка; *ящ* — ядро клетки хозяина; *пк* — пиноцитозные каналы; *пв* — пиноцитозные пузырьки; *пс* — надмембранный слой; *пс* — поперечный срез надмембранного слоя; *тс* — тангенциальный срез надмембранного слоя.
Остальные обозначения, как на рис. 1.

жании их в холодильнике и при комнатной температуре) под влиянием плазмодиев *Kudoa quac'ratum* не происходит.

Henneguya oviperda Паразитирует внутри икринки щуки и, как и предыдущий вид, является внутриклеточным паразитом. У ее вегетативных стадий, представляющих собой округлых плазмодиев, на поверхности обнаруживаются цитоплазматические выросты в виде редких микроворсинок (Шульман, 1966). У более зрелых плазмодиев поверхность более гладкая (рис. 2, 1; см. вкл.). Плазмодии имеют только одну наружную мембрану. Внутри от мембраны в плазмодии отмечаются те же слои цитоплазмы, что и у других крупных плазмодиев миксоспоридий. Сразу за мембраной следует слой, пронизанный пиноцитозными каналами, глубже — богатый митохондриями слой, а затем — зона с вегетативными ядрами, генеративными клетками и стадиями спорогенеза. Здесь сильно развита шероховатая эндоплазматическая сеть. Средняя часть плазмодия вакуолизована и зрелые споры, которые формируются у этого вида по 2 в каждом панспоробласте, оказываются в вакуолях.

Ооцит в зараженной икринке отсутствует; остаются лишь глыбки желтка, которые располагаются снаружи поверхностной мембраны плазмодия. Далее следуют оболочки икринки: *Zona pellucida*, фолликулярный эпителий, базальная мембрана, клетки тэки и другие оболочки, характерные для икринки щуки (рис. 2, 1). Развитие этих слоев, видимо, зависит от времени проникновения паразитов в ооцит.

Паразит использует ресурсы, предназначенные для питания ооцита. О том, что происходит усиленное питание плазмодия, говорит прежде всего наличие сильной пиноцитозной активности у него.

Myxobolus disparoides. Материал по *M. disparoides* был получен на Восточном Памире из маринок *Schizothorax intermedius*, выловленных из реки Мургаб (Ашурова, 1973). Изученные под электронным микроскопом экземпляры *M. disparoides* были обнаружены в терминальной части первичного жаберного лепестка, где приносящий кровеносный сосуд переходит в выносящий. В месте обитания паразита конец жаберного лепестка вздут, нормальное расположение клеток, капилляров вторичных жаберных лепестков и других элементов жаберного лепестка нарушено, кровеносный сосуд отнесен к периферии и сдавлен. От внешней среды паразит отделен лишь тонким слоем жаберного эпителия. С проксимальной стороны лепестка к нему примыкают клетки жаберной ткани, фибриллярный материал, клетки крови, столбчатые клетки и базальная мембрана капилляров, которые попадают на разных срезах.

Вегетативные стадии миксоспоридий этого вида — округло-овальные белые плазмодии, достигающие иногда крупных размеров (2—5 мм). Как и у предыдущих видов, под элементарной мембраной располагается зона тонкогранулированной цитоплазмы, пронизанной пиноцитозными каналами, за которой следует зона, богатая митохондриями и вакуолями с включениями, а затем — зона с вегетативными ядрами, генеративными клетками и стадиями спорогенеза. В панспоробластах этого вида закладываются две споры.

Ультратонкое строение поверхности *M. disparoides* отличается от строения предыдущих двух видов. Снаружи элементарной мембраны плазмодия имеется своеобразный надмембранный слой, в виде слоя низкой электронной плотности одинаковой толщины (приблизительно 0,08 мкм), в точности повторяющий все изгибы поверхности плазмодия. В этом слое равномерно включены более электронноплотные образования, которые на поперечных срезах выглядят как пирамидки, слагающиеся из трех слоев электронноплотного вещества, перемежаю-

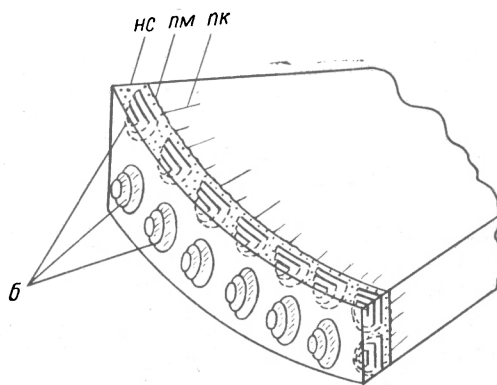


Рис. 3. Схема строения надмембранного (нс) слоя у плазмодия *Myxobolus disparoides*.

б — бугорки с пластинками.

щихся с электронносветлыми слоями одинаковой толщины. Этот рисунок равномерно повторяется вдоль всей поверхности плазмодия на поперечном срезе (рис. 2, 2). На тангенциальном срезе эти образования имеют вид усеченных конусов, бугорков или бляшек, утопленных в электроннопрозрачном веществе. Каждый конус составлен из электронноплотных пластинок разной величины округло-овальной формы, располагающихся на равном расстоянии друг от друга так, что пластинка большего диаметра находится у мембраны плазмодия. Как уже говорилось, пластинки эти утоплены в электроннопрозрачном веществе равномерно по всему его слою (рис. 2, 3). Схематически строение этого слоя представлено на рис. 3. Должно быть, чередование участков, укрепленных такими пластинками, и участков электроннопрозрачных, лишенных укрепления, делает эту оболочку эластичной, способной изгибаться именно благодаря пирамидообразному строению плотных участков.

Как уже говорилось во вводной части статьи, у других видов миксоспоридий, и именно у паразитирующих на жабрах рыб, уже отмечалось наличие надмембранного слоя (гранулярного или частоколообразного). У *M. disparoides* надмембранный слой имеет еще более сложное строение. Может быть, его можно сравнивать с гликокаликсом некоторых амёб, а бугорки с гликостильями, хотя устроены они по-разному. Слой этот интенсивно красится альциановым синим.

Роль этого надмембранного слоя может сводиться к защите плазмодия, придавая ему упругость, необходимую при паразитировании в таких сравнительно мягких тканях, как жаберная, находящихся под постоянным давлением воды. Тем более что благодаря деятельности паразита в них может быть нарушен тургор. С другой стороны, он может играть роль при питании. То, что он проницаем для питательных веществ, подтверждается высокой пиноцитозной активностью плазматической мембраны трофозойта. Видимо, электроннопрозрачные участки проницаемы для веществ, растворенных в лимфе или плазме крови, омывающих паразита, и через них, как через поры, они могут проникать к плазматической мембране трофозойта, а, может быть, при изгибании поверхности и сближении вершин пирамидок даже отжиматься в сторону мембраны.

Можно было бы предположить роль надмембранного слоя в осморегуляции (паразиту пресноводной рыбы, обитающему в разрушенной им жаберной ткани, эти механизмы, видимо, важны так же, как и самой рыбе), тем более что для гликокаликса амёб предполагается роль контроля ионного потока (Page, Blakey, 1979), но, не зная точного химического состава этого слоя, говорить об этом преждевременно.

Из приведенных описаний строения поверхности миксоспоридий на стадии плазмодия, обозначаемых обычно как циста, видно, что оно достаточно разнообразно и может иметь значение для систематики. Строение поверхности отличается у представителей одного рода, но имеющих разную локализацию, (например, у *Henneguya oviperda*, исследованных нами, и у *H. excillis*, по данным других авторов) (Current, Janovy, 1978). Более того, Каррент с соавторами, например, отмечает, что формы одного и того же вида (*H. excillis*), локализуясь в разных участках жабр, имеют разное строение поверхности плазмодиев, и авторы связывают этот факт с патогенностью и непатогенностью этих форм.

Как показывают наши исследования тканевых и полостных миксоспоридий из разных мест обитания электронно-микроскопическими и цитохимическими методами, строение поверхности плазмодиев теснейшим образом связано способами их питания. У изученных нами миксоспоридий были установлены все возможные типы клеточного питания: наружное внеклеточное переваривание пищи с помощью ферментов, выделяемых трофозойтами; пристеночное, контактное или мембранное пищеварение в зоне щеточной каймы; фагоцитоз, пиноцитоз с внутриклеточным пищеварением с помощью ферментов лизосом и активный транспорт. Вопрос о типах питания и обмена у миксоспоридий будет рассмотрен в другой нашей статье.

Л и т е р а т у р а

- Ашурова М. Паразиты рыб реки Мургаб (Памир). — Автореф. канд. дис. Л., 1973. 18 с.
Гинецкая Т. А., Добровольский А. А. Частная паразитология. Т. 1. М., Высшая школа, 1978, 303 с.

- Заварзин А. А. Об изменениях мышечного волокна соматической мускулатуры бычка (*Cottus cottus*) под влиянием внутреннего паразита. — Арх. анат., гистол., эмбриол., 1938, т. 19, вып. 3, с. 333—341.
- Ковалева А. А., Шульман С. С. Многостворчатые микроспоридии рыб. — Тр. ЗИН АН СССР, 1978, т. 78, с. 16—21.
- Успенская А. В. Ультратонкое строение некоторых стадий *Myxidium gasterostei* Noble 1943. — Acta Protozool., 1969, vol. 7, Fasc. 7, p. 71—79.
- Успенская А. В. Электронно-микроскопические, цитохимические и цитофотометрические исследования представителей рода *Sphaerogompha*, паразитирующих в морских рыбах. — В кн.: 7-е Всес. совещ. по паразитам и болезням рыб (тез. докл.). Л., 1979, с. 111—112.
- Шульман С. С. Микроспоридии фауны СССР. Л., Наука, 1966. 504 с.
- (Шульман С. С.) Schulman S. S. New data on the order Multivalvulea (Myxosporidia, Cnidosporidia). — In: 4th Intern. Congr. Parasitol., 1978, Sec. B, p. 15.
- Current W. L. *Henneguya adiposa* Minchev in the channel catfish: Ultrastructure of the plasmodium wall and sporogenesis. — J. Parasitol., 1979, vol. 26, p. 209—217.
- Current W. L., Janovy J. Ultrastructure of interlamellar *Henneguya excillis* in the channel catfish. — J. Parasitol., 1976, vol. 62, p. 975—981.
- Current W. L., Janovy J. Comparative study of ultrastructure of interlamellar and intralamellar types of *Henneguya excillis* Kudo from channel catfish. — J. Protozool., 1978, vol. 25, p. 56—65.
- Current W. L., Janovy J. Jr., Knight S. A. *Myxosoma funduli* Kudo in *Fundulus kansae*: Ultrastructure of the plasmodium wall and sporogenesis. — J. Protozool., 1979, vol. 26, N 4, p. 574—583.
- Desser S. S., Paterson W. S. Ultrastructural and cytochemical observation on sporogenesis of *Myxobolus* sp. from the shiner *Notropis cornutus*. — J. Protozool., 1978, vol. 25, p. 331—326.
- Davis H. S. Studies on sporulation and development of the cysts in a new species of Myxosporidia, *Lentospora ovalis*. — J. Morph., 1923, vol. 37, p. 425—455.
- Kudo R. Contributions to the study of the Parasitic Protozoa. III. Note on Myxosporidia found in some freshwater fishes of Japan, with the description of 3 new species. — J. Parasitol., 1916, vol. 3, N 3, p. 3—9.
- Lom J., Puytorac P. Observation sur l'ultrastructure des trophozoites de Myxosporidies. — C. R. Acad. sci., 1965, vol. 260, p. 2588—2590.
- Nemeczek A. Beiträge zur Kenntnis Myxo- und Microsporidien der Fische. — Arch. Protistenk., 1911, Bd 54, S. 143—149.
- Page F. C., Blakey S. M. Cell surface structure as a taxonomic character in the Thecamoebae (Protozoa, Gymnamoebia). — Zool. J. of the Linnean Soc., 1979, vol. 66, p. 113—135.
- Plehn M. Eine neue Schleienkrankheit. — Alg. Fischerei Ztg., 1925, Bd 28, S. 299—300.
- Schröder O. Eine neue Myxosporidien Art aus den Kiemen von *Acerina cernua* (*Henneguya acerinae* n. sp.). — Arch. Protistenk., 1906, Bd 7, S. 186—196.
- Schubert G. Elektronmikroskopische Untersuchungen zur Sporentwicklung von *Henneguya pinnae* Schubert (Sporozoa, Myxosporidia, Myxobolidae). — Z. Parasitenk., 1968, Bd 30, S. 57—77.

THE ULTRASTRUCTURE OF THE SO-CALLED
«CYSTS» OF SEVERAL MYXOSPORIDIAN SPECIES

A. V. Uspenskaya

SUMMARY

The ultrastructure of the so-called «cysts» of Myxosporidia has been studied. It was found that species investigated (*Kudoa quadratum*, *Henneguya oviperda*, *Myxobolus disparoides*) possess large plasmodia which have nothing in common with cysts of Protozoa.

Large and fusiform plasmodium of *Kudoa quadratum* localizes inside a muscle fiber. The development of trophozoite up to spore maturity takes place inside the same muscle fiber. A lysis of myofibrils takes place only inside of the infected fiber and does not spread throughout the muscle tissue.

The plasmodium surface of *Kudoa quadratum* and *Henneguya oviperda* is covered with a single unit-membrane. Plasmodium of *Myxobolus disparoides* has a complex coat outside of plasma membrane.

The relations between the surface structure and biology of plasmodia and taxonomic value of the former are discussed.