

УДК 576.356.5 + 612.014.22

ЦИТОЛОГИЯ

И. В. УРЫВАЕВА, В. М. ФАКТОР

СКОРОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ ДНК ДИПЛОИДНЫХ И ТЕТРАПЛОИДНЫХ ЯДЕР РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ МЫШИ

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 17 XI 1970)

Для ряда клеток показано, что длительность периода синтеза не зависит от степени пloidности ядра (¹⁻⁵). По-видимому, в этих случаях полипloidия отражает лишь количественные изменения генома, и репликация ДНК всех гомологичных хромосом происходит с той же последовательностью и скоростью, как и в диплоидном ядре.

Однако у тетрапloidного штамма асцитных клеток Эрлиха время синтеза ДНК оказалось вдвое длиннее, чем у диплоидного (⁶). Те же результаты получились при сравнении клеток корешков диплоидных и тетрапloidных форм растений (⁷). Можно предположить, что в этих случаях полипloidия сопровождается изменением генного баланса, структуры хромосом и последовательности их репликации. Таким образом, динамика репликации на отдельных этапах синтетической фазы и общая ее продолжительность может отражать качественные изменения генома полипloidных ядер (⁸).

С другой стороны, для полипloidных ядер характерно изменение поверхностно-объемных отношений (⁹). Объем полипloidного ядра увеличен по сравнению с диплоидным соответственно увеличению содержания ДНК. Тетрапloidные ядра вдвое крупнее диплоидных, но поверхность их увеличена лишь в 1,59 раз. Это обстоятельство может влиять на скорость синтеза ДНК, если места его инициации связаны с ядерной мембраной. Некоторые теории придают мембране ядра главное значение в упорядочении хромосомного материала в интерфазе и регуляции его репликации (^{10, 11}). Методом автордиографии Олферт и Дас (¹²) сравнили среднюю скорость репликации ДНК ядер диплоидного и тетрапloidного *Antirrhinum* и диплоидных и тетрапloidных ядер регенерирующей печени мыши. Средняя интенсивность тимидиновой метки на единицу объема тетрапloidного ядра того и другого объекта была ниже этого показателя диплоидных ядер на 27%, что коррелировало со снижением отношения поверхности к объему на 20%. В настоящей работе, проведенной на клетках регенерирующей печени мыши с использованием иных приемов анализа, эти данные не подтвердились.

У мышей-самцов СВА/С₅₇В1 весом 26—28 г удалялась часть печени по методу Хиггинса — Андерсона. За 1 час до забоя внутрибрюшинно вводился Н³-тимидин с удельной активностью 0,45 С/мМ в дозе 1 мС на 1 г веса. Работа проделана на мазках изолированных клеток. Последние получали путем диспергирования на предметном стекле в капле 0,25 М сахарозы кусочка печени, перфузированной физиологическим раствором. Мазки фиксировали 96° этиловым спиртом и окрашивали по Фельгену (гидролиз в 5 N HCl при 37° 15 мин.). Для анализа были отобраны 4 животных, в препаратах печени которых было много меченых клеток (от 21 до 50%). Эти мыши были взяты через 28—35 час. после операции.

Результаты получены при сочетании цитофотометрического определения содержания ДНК и автордиографического анализа изотопной метки одного и того же ядра. Для этого в мазке предварительно маркировались

клетки. Фотометрирование ядер производилось на зондовом цитофотометре (⁶) в области 498 мμ. Содержание ДНК-фуксина вычислялось как произведение оптической плотности на площадь ядра. После нанесения эмульсии типа М, экспонирования в течение 1—3 недель и обычной обработки в препарате отыскивались фотометрированные ядра и определялась интенсивность их метки путем подсчета зерен серебра. У каждого из 4 животных было измерено 100—150 меченых ядер.

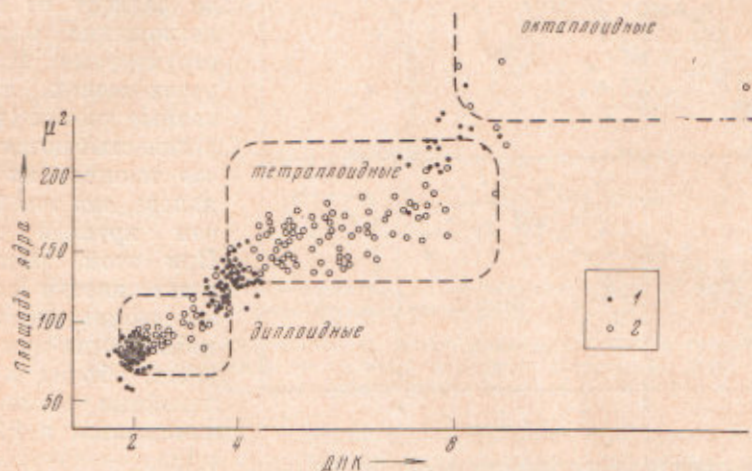


Рис. 1. Диаграмма зависимости площади ядра от содержания в нем ДНК. 1 — немеченые ядра, 2 — меченые ядра. Каждая точка — одно ядро. Результаты измерений у одного животного

Ядра одноядерных и двоядерных клеток с одинаковым содержанием ДНК не различались по интенсивности метки, поэтому они анализируются вместе.

Содержание ДНК определяли также и в немеченых клетках, среди которых были как непролиферирующие, так и клетки в G₁- и G₂-стадиях митотического цикла. Это позволило оценить величину относительной ошибки цитофотометрии — коэффициент вариации ($v = \frac{\sigma}{x} \cdot 100$), который составил для диплоидных ядер 8,2%, для тетра- и октаплоидных 6,5% (рис. 1). Такая сравнительно низкая методическая ошибка в определении содержания ДНК дает возможность четко идентифицировать диплоидные, тетраплоидные и октаплоидные репродуцирующиеся ядра. Трудно бывает разграничить диплоидные ядра, завершающие фазу синтеза, от тетраплоидных, начинающих ее (соответственно заканчивающие синтез тетраплоидные от октаплоидных), которые неразличимы по содержанию ДНК при $v = 6-8\%$. Для этой цели был использован размерный критерий, как это показано на рис. 1. Диплоидные ядра, завершающие синтез ДНК, мельче, чем тетраплоидные в начале синтетической фазы.

Из рис. 2 видно, что динамика включения Н³-тимидина на разных этапах фазы синтеза ДНК одинакова для диплоидных и тетраплоидных ядер: наиболее сильно мечены клетки, удвоившие больше половины исходного количества ДНК, слабее метятся клетки в начале и конце синтеза. Такая динамика включения Н³-тимидина характерна для большинства изученных тканей животных и растений (¹³). Как видно из рис. 3, у диплоидных и тетраплоидных ядер одинаков и ритм роста, происходящего вместе с репродукцией ДНК. Однако интенсивность включения Н³-тимидина тетраплоидными ядрами на всех этапах стадии синтеза ДНК превышала этот показатель диплоидных ядер в среднем всего в 1,6 раза (от 1,5 до 1,68 для разных случаев). Это видно и из рис. 4, где относительная интенсивность метки представлена для сравнения в расчете на единицу массы ДНК.

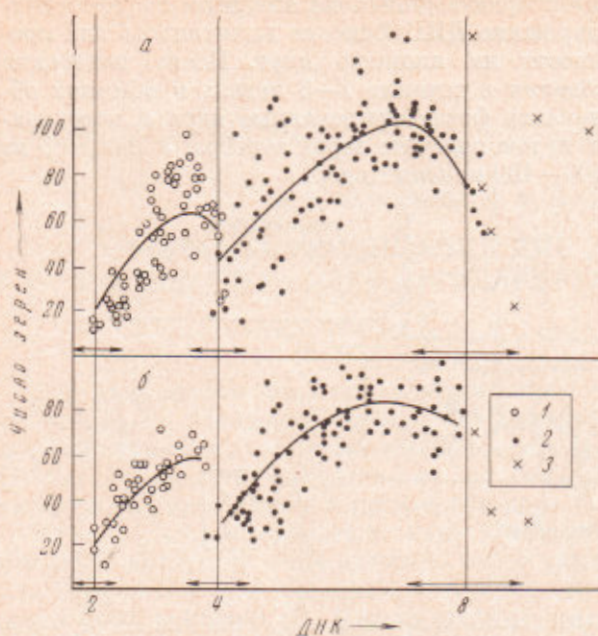


Рис. 2. Зависимость интенсивности метки диплоидных (1), тетраплоидных (2) и октаплоидных (3) ядер от содержания в них ДНК. Каждая точка — одно ядро. Стрелки ограничивают 95% доверительные интервалы для ди-, тетра- и октаплоидного количества ДНК. Приведены результаты по двум животным — а, б

тах, так как площадь тетраплоидных немеченых ядер в 1,6 раза больше площади немеченых диплоидных ядер (рис. 1). Можно ожидать, что в тетраплоидных ядрах большая часть энергии включенной радиоактивности поглощается структурами по сравнению с диплоидными. Кроме ядра, поглощает слой цитоплазмы, который также толще в более крупных клетках.

Имеются данные ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ о величине ослабления тритиевого излучения в зависимости от плотности поглотителя. Определено ⁽¹⁵⁾ влияние толщины алюминиевого поглотителя на скорость счета тритиевых β -частиц. Подсчитано ⁽¹⁶⁾ число зерен в автордиографической эмульсии над срезами печени разной толщины после введения животному аминокислотной метки. Теоретически на основе учета энергии электронов трития был вычислен ⁽¹⁷⁾ процент частиц, проходящих данную толщину материала. В итоге каждой из трех работ даются довольно сходные кривые абсорбции излучения в зависимости от плотности поглотителя ($\text{мг}/\text{см}^2$).

Чтобы воспользоваться проведенными расчетами, мы определили плотность поглощающего слоя для диплоидных и тетраплоидных ядер ($\text{М}/\text{см}^2$) с помощью интерференционного микроскопа типа «Ширинг». В неокрашенном мазке изолированных гепатоцитов ориентировочно, по размеру, выбирали клетки, содержащие тетраплоидные ядра. Интерферометрически определили оптическую разность хода для поглощающего слоя, включающего в себя ядро и расположенный над и под ним слой цитоплазмы. Она составила для тетраплоидных ядер в среднем из 20 измерений $0,35 \lambda$ (в дистиллированной воде, при $\lambda 540 \text{ м}\mu$). Массу вещества ($\text{М}/\text{см}^2$) вычисляли по формуле:

$$M/\text{см}^2 = \frac{108}{\alpha} \text{ мг}/\text{см}^2,$$

где δ — оптическая разность хода в см, $\alpha = 0,0018 \text{ см}^2/\text{г}$. Для тетраплоидных ядер эта величина составила $0,106 \text{ мг}/\text{см}^2$. Из приведенных выше рас-

Известно, что при использовании тритиевых β -излучателей регистрируемая автордиографически величина радиоактивности в виде числа зерен серебра зависит от степени поглощения излучения структурами. В препаратах-мазках изолированные клетки (и ядра) распластаются так, что толщина их неодинакова, она тем больше, чем крупнее клетки. При этом, распластываясь, клетки сохраняют геометрическое подобие; тогда при увеличении объема в 2 раза линейные размеры увеличиваются в $\sqrt[3]{2}$, а площади в $(\sqrt[3]{2})^2$, а площади в $(\sqrt[3]{2})^2$ ⁽¹⁴⁾. По-видимому, таким образом распластаны клетки в наших препара-

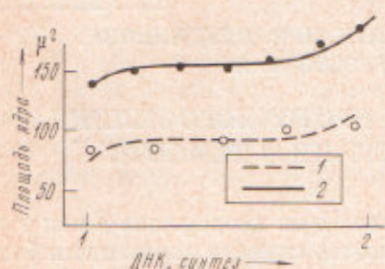


Рис. 3

Рис. 3. Изменение площади диплоидных (1) и тетраплоидных (2) ядер в течение фазы синтеза ДНК

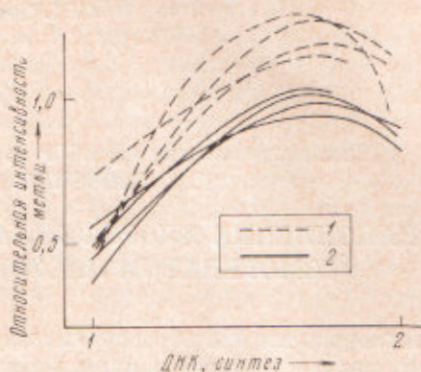


Рис. 4

Рис. 4. Относительная интенсивность метки диплоидных (1) и тетраплоидных (2) ядер, рассчитанная на единицу исходного количества ДНК. Представлены данные по 4 животным

суждений о геометрии ядер в мазке ясно, что для диплоидных количество поглощающего вещества на ту же площадь должно быть меньше в 1,26 раза, т. е., оно равно $0,084 \text{ мг/см}^2$. Этим величинам по каждой из трех кривых соответствуют коэффициенты самопоглощения, которые показывают, что излучение у тетраплоидных ядер ослаблено больше, чем у диплоидных ядер, в среднем в 1,2 раза (в 1,2; 1,25; 1,15 при использовании трех кривых приведенных выше авторов). Значит, отношение интенсивностей метки тетраплоидных и диплоидных ядер, равное 1,6, является артефактом метода автордиографии. При коррекции на величину самопоглощения это отношение приближается к 2.

Таким образом, можно считать, что тетраплоидные ядра включают в 2 раза больше радиоактивного предшественника, чем диплоидные ядра, проходящие тот же этап синтеза ДНК. Поэтому средняя скорость синтеза ДНК на единицу ее количества и общая длительность ее репродукции должны быть одинаковыми у ядер разной пloidности. Интересно, что у сравниваемых типов ядер одинаковыми оказались также ритм роста и изменение скорости синтеза на отдельных этапах репродукции ДНК. Все эти результаты позволяют рассматривать геном полиплоидных гепатоцитов как сумму полностью гомологичных диплоидных наборов, что соответствует представлению (9) о соматической полиплоидии как способе регуляции количественных показателей клетки.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
27 X 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. M. Rasch, *Exp. Cell Res.*, **36**, 3, 475 (1964). ² J. Van't Hof, *Exp. Cell Res.*, **41**, 2, 274 (1966). ³ Л. Ф. Андреева, В кн.: Исследование клеточных циклов и метаболизм нуклеиновых кислот при дифференциации, М.—Л., 1964, стр. 136.
- ⁴ M. R. Troy, D. E. Wimber, *Exp. Cell Res.*, **53**, 1, 145 (1968). ⁵ D. P. Yang, E. O. Dodson, *Chromosoma*, **31**, 3, 309 (1970). ⁶ V. Defendi, L. A. Manson, *Nature*, **198**, 4878, 359 (1963). ⁷ J. Van't Hof, *Exp. Cell Res.*, **39**, 1, 48 (1965).
- ⁸ Л. Н. Живкин, В. К. Нилова, Усп. совр. биол., **65**, 2, 233 (1968). ⁹ В. Я. Бродский, Трофика клетки, М., 1966. ¹⁰ А. Н. Мосолов, Генетика, **4**, 12, 135 (1968).
- ¹¹ D. E. Comings, *Am. J. Human Genet.*, **20**, 5, 440 (1968). ¹² M. Alfert, N. K. Das, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **63**, 1, 123 (1969). ¹³ Е. С. Беляева, И. С. Губенко, Цитология, **12**, 4, 473 (1970). ¹⁴ Ch. J. Epstein, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 2, 327 (1967).
- ¹⁵ R. J. Fitzgerald, M. L. Eidinoff et al., *Science*, **114**, 2967, 494 (1951). ¹⁶ W. Maurer, E. Primbsch, *Exp. Cell Res.*, **33**, 1—2, 8 (1964). ¹⁷ S. R. Pelc, M. G. E. Welton, *Nature*, **216**, 5118, 925 (1967).