

В. Я. БРОДСКИЙ, К. Ю. РЕЗНИКОВ

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ХРОМОСОМНОГО НАБОРА
В КЛЕТКАХ ПУРКИНЬЕ, СОДЕРЖАЩИХ РАЗНОЕ КОЛИЧЕСТВО
ДНК, ПО ПОЛОВОМУ ХРОМАТИНУ**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 17 III 1971)

Количество ДНК в клетках Пуркинье мозжечка новорожденных крыс соответствует диплоидному набору хромосом, а у взрослых животных — тетраплоидному (^{1, 2}). Уточнение сроков удвоения количества ДНК показало, что оно происходит с 10 по 25 день постнатальной жизни (^{3, 4}).

Оставалось неясным состояние хромосомного набора клеток с тетраплоидным содержанием ДНК. Могли быть высказаны два предположения: 1) клетки с удвоенным количеством ДНК имеют тетраплоидный набор хромосом; 2) репродукция ДНК и всего материала хромосом не сопровождается их делением: клетки выходят из митотического цикла в G₂-периоде, имея удвоенный (премитотический) диплоидный набор хромосом.

Одним из подходов для выяснения состояния ядер с увеличенным количеством ДНК может явиться изучение полового хроматина (⁵). Эта возможность использована в нашей работе. В ядре диплоидных клеток самок, как известно, обнаруживается одна глыбка полового хроматина, в состав которой входит гетерохроматизированная X-хромосома или постоянные по массе гетерохроматические участки двух X-хромосом (^{6, 7}). В изученных тетраплоидных ядрах найдены две глыбки полового хроматина, причем каждая из них содержала столько же ДНК, сколько единственная глыбка диплоидного ядра (^{6, 8}). В клетках G₂-популяции, репродуцировавших хромосомы, но не приступивших к их делению, должна быть одна глыбка полового хроматина с удвоенным, сравнительно с интерфазным ядром, содержанием ДНК.

Конъюгация гомологичных хромосом после митоза может привести к тому, что и в тетраплоидном ядре будет одна удвоенная глыбка полового хроматина (^{9, 10}). Однако для клеток Пуркинье этот эффект исключен, так как после репродукции ДНК эти клетки не приступают к митозу. Наконец, увеличение количества ДНК в половом хроматине может произойти за счет его соединения с гетерохроматизированными участками аутосом. В таком случае должен различаться характер распределения гетерохроматина в ядрах с диплоидным и вдвое большим количеством ДНК и мало вероятно, чтобы содержание ДНК в глыбке полового хроматина строго удваивалось.

Исследовали ядра клеток Пуркинье мозжечка четырехдневных и трехмесячных самок крыс линии Вистар. После декапитации мозжечок разрезали саггитально. К разрезу прикладывали предметное стекло. Подсушенные отпечатки ткани фиксировали в течение 30 мин. метиловым спиртом. На таких препаратах обнаруживаются в основном ядра различных клеток; среди них ядра клеток Пуркинье четко выделяются своим большим размером и тонкой структурой. Реакцию Фельгена проводили в следующих условиях: гидролиз в 5 N HCl при 37° в течение 8 мин., окраска в реактиве Шиффа 2 часа. В ядрах на отпечатках изучали положение глыбок хроматина и подсчитывали их число. На зондовом цитофотометре двухволновым методом (^{11, 12}) определяли количество ДНК-фуксина в отдельных глыбках полового хроматина. Распределение глыбок хроматина изучено в 400 ядрах

клеток Пуркинье четырех животных каждого возраста, фотометрировали глыбки в 100 ядрах. Основная трудность в изучении полового хроматина заключается в его визуальном выделении среди других хроматиновых глыбок интерфазного ядра. Однако наша задача позволяла ограничиться достаточно усредненной картиной. И кроме того, анализ полового хроматина в крупных нейронах облегчается тем, что ядра этих клеток содержат большое число хроматиновых глыбок, среди которых половой хроматин выделяется размером и часто формой ⁽¹³⁾. В частности, для клеток Пуркинье мозжечка крыс установлено, что половым хроматином могут быть только глыбки, расположенные на периферии ядра. Околоядрышковый хроматин в этих клетках встречается у крыс-самцов гораздо чаще, чем у самок и, следовательно, не имеет отношения к половому хроматину ⁽¹⁴⁾.

Т а б л и ц а 1
Распределение хроматина в ядрах клеток Пуркинье
самок крыс в %

Объект	Отпечатки		Срезы * мозга взрослых животных
	4 дня	3 мес.	
Одна крупная глыбка, расположенная у оболочки ядра	35	41	43
Такая же глыбка и околоядрышковый хроматин	18	21	5
Только околоядрышковый хроматин	25	22	33
Несколько крупных глыбок хроматина в кариоплазме	16	10	6
Глыбки хроматина отсутствуют	6	6	13

* По данным Хинрихсена и Готе (1958)

В табл. 1 суммированы результаты анализа распределения хроматина в клетках Пуркинье мозжечка крыс. Наши данные, полученные при изучении целых ядер на отпечатках ткани, сравниваются с аналогичным исследованием срезов мозжечка ⁽¹⁴⁾. Распределение хроматина у четырехдневных и трехмесячных крыс практически не отличается (табл. 1). Около 40% ядер содержат всего одну крупную хроматиновую глыбку. Ее удлиненная форма и типичное пристеночное расположение показывают, что здесь скорее всего определяется половой хроматин. Такая же по форме и расположению глыбка может сочетаться в одном ядре с мелкими хроматиновыми глыбками, расположенными вокруг ядрышка. В общей сложности не менее половины (50—60%) ядер содержат одну крупную глыбку хроматина на периферии ядра. Приблизительно в трети ядер обнаруживается только околоядрышковый хроматин. В некоторых ядрах не видели ни одной хроматиновой глыбки. Наконец небольшое число, порядка 10%, ядер содержало несколько хроматиновых глыбок, расположенных вне ядрышка. На срезах ⁽¹⁴⁾ видно, что этот хроматин не примыкает и к ядерной оболочке. Однако, учитывая относительность критерия локализации, можно допустить, что в ядрах с несколькими крупными хроматиновыми глыбками может оказаться глыбка полового хроматина.

Таким образом, для клеток Пуркинье мозжечка четырехдневной и трехмесячной крысы характерна только одна глыбка полового хроматина. В ядрах клеток Пуркинье, отличающихся по содержанию ДНК у животных разного возраста, наблюдалось одинаковое распределение хроматина. Эти данные говорят против полиплоидного характера ядер с удвоенным количеством ДНК.

Цитофотометрия ДНК проводилась в крупных глыбках хроматина, имеющих удлиненную или треугольную форму и расположенных вблизи

ядерной оболочки. Во всяком случае, многие такие глыбки представляют собой половой хроматин. На рис. 1 представлены гистограммы содержания ДНК в отдельных глыбках полового хроматина у животных разного возраста. Гистограмма трехмесячных крыс существенно сдвинута в сторону больших значений ДНК, сравнительно с гистограммой четырехдневных животных. Среднее количество ДНК в глыбке полового хроматина взрослых крыс вдвое выше, чем у крысят. С учетом 95-процентного доверительного интервала количество ДНК в половом хроматине у четырехдневных крысят может находиться от 109 до 126 сравнимых единиц, а у трехмесячных крыс от 242 до 278 единиц. Среднее количество ДНК в глыбке полового хроматина, так же как и общее количество ДНК в ядре клетки Пуркинье, удваивается у взрослой крысы по сравнению с четырехдневной. Вывод о пропорциональности количества ДНК в половом хроматине и в целом ядре был ранее сделан для фибробластов, изученных в разные периоды митотического цикла, а также для диплоидных и полиплоидных клеток эпителия амниона человека (6, 8).

Таким образом, в первые недели постнатальной жизни крысы в половом хроматине клеток Пуркинье количество ДНК удваивается. В это время во всех клетках Пуркинье удваивается общее количество ДНК. Поскольку глыбка полового хроматина остается единственной, мы приходим к выводу, что после синтеза ДНК (который подтверждают и первые автордиографические данные (4)) клетки Пуркинье выходят из митотического цикла в G₂-периоде. Затем в течение всей жизни животного ядра клеток Пуркинье содержат двоянные хромосомы, а не разделенный тетраплоидный набор.

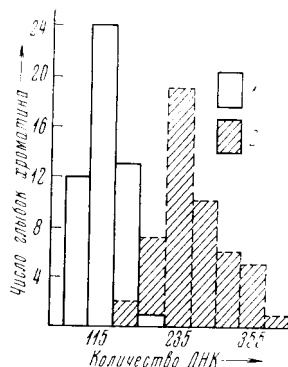


Рис. 1. Гистограммы содержания ДНК в половом хроматине клеток Пуркинье мозжечка четырехдневных (1) и трехмесячных (2) крыс

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
12 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Я. Бродский, А. А. Куш, ДАН, **147**, 713 (1962). ² L. W. Lapham, Science, **159**, 310 (1968). ³ W. Sandritter, V. Novakova et al., Zs. Zellforsch., **80**, 145 (1967). ⁴ В. Я. Бродский, Г. А. Соколова, Т. Е. Монакова, Онтогенез, **2**, 33 (1971). ⁵ В. Я. Бродский, И. В. Урываева, Онтогенез, **1**, 229 (1970). ⁶ H. Klinger, H. Schwarzscher, J. Biophys. and Biochem. Cytol., **8**, 345 (1960). ⁷ Основы цитогенетики человека, А. А. Прокофьева-Бельговская (ред.), М., 1969. ⁸ H. Klinger, H. Schwarzscher, Y. Weiss, Cytogenetics, **6**, 1 (1967). ⁹ S. Ohno, W. Kaplan, R. Kinoshita, Exp. Cell. Res., **18**, 415 (1959). ¹⁰ S. Kelly, A. Rydia, Cytologia, **34**, 258 (1969). ¹¹ Л. С. Агроскин, В. Я. Бродский и др., Цитология, **2**, 337 (1960). ¹² А. И. Шерудило, Изв. СО АН СССР, **12**, 145 (1964). ¹³ M. Barr, Science, **130**, 679 (1959). ¹⁴ K. Hinrichsen, H. Gothe, Zs. Zellforsch., **48**, 429 (1958).