

А. А. ЧИЛИНГАРЯН, Е. Ф. ПАВЛОВ, Л. П. МКРТЧЯН

ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ДНК В ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ
У КРОЛИКОВ ПРИ МЕЖПОРОДНОМ СКРЕЩИВАНИИ

Среди многообразных форм размножения, объединяемых понятием цитогонии, для высших позвоночных наиболее характерным вариантом бесспорно является сингамия, при которой обязательно имеет место объединение двух половых клеток, происходящих от разных особей.

Давно уже известно, что характер развития индивидуума, возникающего в результате слияния гамет, во многом определяется генетическим происхождением предков. Как правило, от генетически разнокачественных родителей, при прочих равных условиях, обычно получают более жизнеспособные и высокопродуктивные животные. В случаях же генетической однородности гамет зачастую имеет место появление слабого, маложизнеспособного, а порой и просто дефективного потомства. Оба вышеназванных типа развития потомства различного генетического происхождения обычно рассматриваются либо как гетерозис в первом случае, либо как депрессия во втором. Имеется не мало исследований, подробно характеризующих оба эти явления по общим показателям развития, интерьерным особенностям, отклонениям в физиологических и биохимических реакциях. Подобные характеристики несомненно дают материал для суждения о специфике онтогенеза особей с различным генетическим происхождением, но не затрагивают вопросов, связанных с цитологическими основами, определяющими в конечном счете то или иное направление развития особей. Цито-морфология также не в состоянии дать исчерпывающие данные в этом направлении, т. к. тот или иной тип развития в первую очередь определяется не изменением целлюлярных структур, а уровнем и интенсивностью биохимических процессов, протекающих в клетках. Таким образом, для характеристики особенностей развития гибридных организмов на клеточном уровне, наиболее многообещающими оказываются биохимические и гистохимические методы.

Если учесть, что в процессе образования зиготы количественно равноценными компонентами являются только ядра гамет, в то время как цитоплазматическая часть представлена почти исключительно материнской яйцеклеткой, то станет очевидной целесообразность получения данных, характеризующих особенности гетерозиготных ядер. Это положение в равной мере относится к ядрам как половых, так и соматических клеток, поскольку вторые во всех случаях рассматриваются как производные первых.

Наиболее удобным объектом для получения данных об изменении различных компонентов ядра, возникающих в результате гетерогенного скрещивания, по нашему представлению являлась ДНК. Данное соединение обязательно входит в состав ядерных структур в достаточно больших количествах для того, чтобы в случае резких изменений, претерпеваемых ядрами в процессе оплодотворения, отразить в размерах, улавливаемых методами современного анализа, количественные сдвиги этой нуклеиновой кислоты, если таковые возникнут в процессе образования гетерогенной зиготы.

В качестве объекта для исследования изменений ДНК были избраны изолированные ядра печени кроликов пород серый и белый великан и их помесей, полученных от прямого и реципрокного скрещивания. Выбор печени как источника для получения изолированных ядер был обусловлен достаточно хорошей изученностью содержания ДНК в этом органе [8]. Выделение ядер производилось по видоизмененной методике Даунса [7]. 50 г измельченной печени помещалось в гомогенизатор пропеллерного типа вместе с 70 см³ одномолярного раствора лимонной кислоты и 200 см³ дистиллированной воды. Гомогенизация проводилась в течение 1,5—2 мин. при 6—7 тысячах об/мин. пропеллера. Полученный гомогенат в течение 16—18 час. фильтровался через фланелевый фильтр.

По окончании фильтрования гомогенат центрифугировался в течение 20 мин. при 2200 об/мин. Полученный осадок промывался раствором лимонной кислоты той же концентрации и повторно осаждался центрифугированием в том же режиме. Третье промывание осадка производилось также, как и предыдущие. Центрифугирование производилось при 1500 об/мин. в течение получаса. Полученный чистый осадок, содержащий изолированные ядра, гомогенизировался в 50 см³ рабочего раствора лимонной кислоты и из этого гомогената брался 1 см³ взвеси для подсчета ядер в камере Горяева, с предварительным разведением в 10—15 раз. Остальной гомогенат центрифугировался при 3500 об/мин. в течение 10 мин. и промывался дистиллированной водой. Все операции по выделению изолированных ядер проводились в холодной комнате с температурой 0—4°C. Путем перерасчета в полученном осадке определялось число ядер. Определение ДНК в ядрах проводилось по методу Дише с дифениламиновым реактивом.

В процессе постановки опытов было использовано 24 кролика пород белый и серый великан и их помеси, полученные от прямого и реципрокного скрещивания по 6 гол. в каждой группе. Возраст животных колебался в пределах 8—12 мес. Данные о содержании ДНК в одном ядре у кроликов различного генетического происхождения приведены в табл. 1.

Из таблицы видно, что количество ДНК, приходящееся на одно ядро у кроликов, относящихся к различным породам, почти одинаково и составляет в среднем для белого великана 10,8 и для серого 10,5 · 10⁻⁹ мг. Различия по содержанию ДНК в ядрах печени помесных кроликов также не большие. Так, межпородные помеси, полученные от скрещивания самки породы белый великан с самцом породы серый ве-

Т а б л и ц а 1
Содержание ДНК в изолированных ядрах печени чистопород-
ных и помесных кроликов

№№ по порядку	Белый ве- ликан	Серый ве- ликан	Помесь ♀ 6/♂ с	Помесь ♀ с/♂ 6
	содержание ДНК в 1 яд- ре мг 10^{-9}	содержание ДНК в 1 яд- ре мг 10^{-9}	содержание ДНК в 1 яд- ре мг 10^{-9}	содержание ДНК в 1 яд- ре мг 10^{-9}
1	10,7	11,8	11,4	12,0
2	10,8	8,9	13,7	11,5
3	12,2	9,6	13,7	11,9
4	10,8	10,2	10,2	12,0
5	10,5	11,5	11,7	9,5
6	10,5	10,8	11,7	13,0
Среднее	10,8	10,5	12,1	11,3

ликан, в среднем на ядро имели $12,1 \cdot 10^{-9}$ мг ДНК, а у помесей, полученных от скрещивания самки породы серый великан с самцом породы белый великан, эти величины составляли $11,3 \cdot 10^{-9}$. Статистическая обработка на достоверность разницы содержания ДНК в ядрах печени у чистопородных кроликов также указывает на отсутствие реальных различий по этому показателю. Такие же результаты получаются и при сравнении между собой групп помесных кроликов. Отсутствие достоверной разницы внутри групп чистопородных и помесных кроликов по содержанию ДНК дает основание для проведения сравнения между чистопородными и помесными кроликами вне зависимости от породной принадлежности и типа скрещивания. Такое сравнение показывает, что среднее содержание ДНК в ядрах печени кроликов пород белый и серый великан составляет $10,72 \pm 0,23$ мг. 10^{-9} , а у помесей, полученных при прямом и реципрокном скрещивании, среднее содержание ДНК на ядро достигает $11,85 \pm 0,29$ мг. 10^{-9} . Статистическая обработка этих величин показывает, что найденные различия реальны, т. к. достоверность разницы равна 3,01. Таким образом, одна из отличительных особенностей гетерогенного скрещивания по сравнению с «гомогенным» заключается в повышенном содержании ДНК, приходящейся на одно ядро.

Поскольку ДНК является одним из основных компонентов клеточного ядра, было вполне естественным предпринять попытку связать увеличение количества ДНК в ядрах клеток помесных кроликов с величиной клеточных ядер. Сравнительные данные о размерах ядер у чистопородных и помесных кроликов тех же пород в лаборатории были получены А. А. Чилингаряном [4] на материале эпителиальных клеток тонкого отдела кишечника новорожденных крольчат. Статистическая характеристика размера ядер у кроликов различного генетического происхождения приводится в табл. 2.

Вычисленный коэффициент достоверности показывает наличие реальной разницы как между породами белый и серый великан, так и

Т а б л и ц а 2

Размеры ядер у чистопородных и помесных кроликов

Порода кроликов	n	Характеристика размеров площадей ядер (в мк^2)	
		$M \pm m$	$\frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$
Белый великан	200	$27,38 \pm 0,41$	5,89
Серый великан	200	$21,38 \pm 0,34$	4,78
Помеси			
♂ белый великан ♀ серый великан	200	$29,26 \pm 0,43$	6,13

между помесами и родительскими формами. Не вдаваясь в подробный анализ причин, обуславливающих породные различия в величине ядер, можно отметить, что их размеры у животных помесного происхождения в обоих случаях превосходят тот же показатель у пород, принимавших участие в скрещивании. Таким образом, повышение количества ДНК в соматических ядрах помесных кроликов представляется возможным поставить в связь с увеличенными размерами ядер*. Многие исследователи, отмечавшие изменение количества ДНК в различных экспериментальных условиях, обычно связывают подобные сдвиги с явлением полиплоидии. Однако в рассматриваемом случае, когда основным воздействием является межпородное скрещивание, подобное объяснение увеличения количества ДНК вряд ли можно рассматривать как единственно приемлемое. Не исключена возможность, что повышенное содержание ДНК следует поставить в зависимость не только от полиплоидии, а и от особенностей метаболизма клетки, которые возникают в результате гетерогенного оплодотворения.

Возможный вариант объяснения биологического значения увеличения количества ДНК в гетерозиготных ядрах вытекает из участия ДНК в метаболических процессах, протекающих в клетке. В приложении к гибридным организмам (межвидовые гибриды ящерид, уток и тканевые гибриды между пекинской и мускусной утками) это положение было высказано нами в двух предыдущих сообщениях [5, 6]. Значительное увеличение количества ДНК у гибридов (до 30—50% по сравнению с исходными формами) мы рассматривали как создание иных условий синтеза нуклеиновых кислот в результате гетерогенного оплодотворения и допускали, что подобное увеличение является биохимической основой для последующего формирования фенотипических признаков и свойств.

* Несоответствие между разницей в размерах ядер у кроликов пород белый и серый великан с одной стороны и отсутствие реальных различий в количестве ДНК в ядрах печени тех же пород с другой стороны, по-видимому, можно объяснить относительно постоянным содержанием ДНК у взрослых представителей одного и того же вида, которое непосредственно не связано с величиной ядер, в то время, как гетерогенное скрещивание приводит к нарушению сложившихся соотношений между отдельными компонентами ядра.

гибридных организмов. Достаточно вероятно, что такое изменение содержания ДНК может найти свое морфологическое выражение через увеличение размера ядер, отражающее определенный уровень метаболических процессов. Позже, Чечеткин и Савронь [3] отметили также у межпородных помесей кур увеличение количества нуклеиновых кислот в ткани белкового отдела яйцевода по сравнению с исходными породами, принимавшими участие в скрещивании. Однако определение количества ДНК в единице навески ткани не дает оснований для суждения о количественных изменениях этого соединения в отдельных ядрах, т. к. оно может быть в равной мере связано как с увеличением массы отдельных ядер, так и с чисто пролиферативными процессами, зачастую приводящими к увеличению числа клеток в одном и том же объеме ткани. Представление, связывающее изменение количества ДНК не только с генетическими, но и обменными процессами, хорошо гармонирует с фактами, имеющимися в литературе о том, что различного рода функциональные нагрузки ведут к активированию синтеза белков и нуклеиновых кислот. Так, для сердечной мышцы это было показано Заком [11] и Ф. З. Меерсоном, Е. М. Лейкиной, Т. Д. Белошапкиной [2]; для печени, почки, поджелудочной железы—Манделем [9] и Симпсоном [10]; В. Я. Бродский [11] также приводит обширный материал по увеличению количества ДНК в ядрах различных соматических клеток в процессе физиологической регенерации, связывая это явление с процессом полиплоидизации. По-видимому, при гетерогенном оплодотворении в ядрах клеток складываются условия в известной мере сходные с теми, которые приводят к повышению содержания нуклеиновых кислот при физиологических нагрузках. Если во втором случае поток внешних раздражителей приводит к усилению обменных процессов и в том числе к увеличению ДНК, то в первом случае роль таких раздражителей следует отнести за счет объединения разнокачественных гамет, в результате которого закладываются химико-биологические основы для становления таких свойств гибридов, как повышение резистентности, расширение границ пластичности, мощного развития и др.

Зоологический институт
АН АрмССР

Поступило 20.IV 1964 г.

Ա. Հ. ԶՐԻՆԳԱՐՅԱՆ, Ե. Ֆ. ՊԱՎԼՈՎ, Լ. Պ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ

ՄԻՋՑԵՂԱՅԻՆ ՏՐԱՄԱԽԱԶՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԴԵԶՈԲՄԻՐԻԲՈՆՈՒԿԼԵՆԱԹԹՎԻ ՔԱՆԱԿԻ ՓՈՓՈԽՄԱՆ ՎՐԱ
ՃԱԳԱՐՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԲԶԻՋՆԵՐԻ ԿՈՐԻՋՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հանրահայտ է, որ սևոական բջիջների միաձուլման հետևանքով առաջացող անհատի զարգացման բնույթը մեծ չափով պայմանավորված է նախնիքների գենետիկական ծաղումով:

Որպես կանոն գենետիկորեն տարրակ ծնողներից սովորաբար ստացվում են ավելի կենսունակ և բարձր մթերատու կենդանիներ: Սեռական բջիջները գենետիկական համասեռության դեպքում ստացվում է թույլ և անկենսունակ սերունդ: Սովորաբար այդ պրոցեսները բնութագրվում են զարգացման ընդհանուր ցուցանիշներով, սակայն դրանք չեն շոշափում հարցի բջջաբանական կողմը, որով կանխորոշվում է անհատի զարգացման ուղղությունը: Մեր կարծիքով [5], այդ տեսակետից հետաքրքիր նյութեր կարելի է ստանալ բջիջ կարևորագույն նյութի՝ դեզոքսիռիբոնուկլեինաթթվի (ԴՆԹ) քանակական կազմակերպման ասիմետրիկություններից:

ԴՆԹ-ի քանակական փոփոխություններն ուսումնասիրելու նպատակով վերցրել ենք ճագարների գորշ ու սպիտակ հսկա ցեղերը, ինչպես նաև նրանց ուղղակի ու հետադարձ տրամախաչումից ստացված խառնածինները, ամենամիսներից 6 գլուխ: ԴՆԹ քանակը որոշվում էր լյարդի մեկուսացրած կորիզներում Փորձի արդյունքները զետեղված են աղյուսակ 1-ում: Ինչպես երևում է բերված տվյալներից, ծնողական ձևերը ԴՆԹ-ի քանակությամբ իրարից համարյա չեն տարբերվում: Նույն երևույթը դրսևորվում է նաև տարբեր ձևով ստացված երկու տիպի խառնածինների միջև: Սակայն, ծնողական ու խառնածին ճագարների համեմատությունը, անկախ նրանց ցեղային պատկանելությունից, ցույց է տալիս, որ ԴՆԹ-ի միջին քանակը սպիտակ և գորշ հսկաների լյարդի մեկ կորիզում, միջին հաշվով, ավելի ցածր է, քան խառնածինների լյարդի կորիզներում: Վերջիններիս մոտ այն գերազանցում է 10,5%: Հաշվի առնելով ԴՆԹ-ի քանակի և կորիզի մեծության փոխադարձ կապը, աղյուսակ 2-ում բերվում են տվյալներ ճագարների ու նրանցից ստացված խառնածինների աղիքի բարձր մասի կտրվածքի կորիզների չափը: Ինչպես ցույց են տալիս հետազոտությունները, խառնածինների կորիզի մեծությունն զգալիորեն գերազանցում է ծնողական ձևերի կորիզներին [4]:

Այսպիսով, միջցեղային տրամախաչումից ստացված սերունդների մոտ համեմատած ծնողական ձևերի հետ, նկատվում են բջիջի կարևորագույն նյութերից մեկի՝ ԴՆԹ-ի քանակի ավելացում և բջիջի կորիզի մեծացում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бродский В. Я. Журн. Общей биологии, т. 25, 1, 1964.
2. Меерсон Ф. З., Лейкина Е. М., Белошапкина Т. Д. ДАН СССР, т. 149, 3, 1963.
3. Савронь Е. С., Чечеткин А. В. Сборник работ молодых ученых. Всес. н.-и институт птицеводства. Вып. 5, 1963.
4. Чилингарян А. А. ДАН АрмССР, т. XXXIX, 4, 1964.
5. Чилингарян А. А., Павлов Е. Ф. ДАН АрмССР, XXXII, 1, 1961.
6. Чилингарян А. А., Павлов Е. Ф., Мкртчян Л. П. Изв. АН АрмССР (биол. науки), т. 15, 12, 1962.
7. Doupse A. Нуклеиновые кислоты, т. 1, Москва. Изд-во иностранной литературы, 1957.
8. Leslie. Нуклеиновые кислоты, т. 1, Москва, Изд-во иностранной литературы, 1957.
9. Mandel L., Winizert M., Jacob M., Pery M., Mandel P., C. R. Soc Biol., 151, 32, 1957.
10. Simpson D. P. Amer. Jour. Physiol., 201, 3, 1961.
11. Zacc R. Federation proceedings, v. 21, 2, 1962.