

Ю. А. МАГАКЯН, Е. М. КАРАЛОВА

О ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ КОЛИЧЕСТВОМ ДНК В ЯДРАХ И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ И СПЕЦИАЛИЗАЦИЕЙ КЛЕТОК В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

На примере клеток Пуркинье мозжечка эмбрионов кур методом цитоспектрофотометрии показано, что содержание ДНК в их ядрах увеличивается (в среднем на 60%) при сохранении ее концентрации. Происходит это за счет появления в популяции клеток, содержащих гипердиплоидное, тетраплоидное и гипертетраплоидное количество ДНК. Клетки Пуркинье не делятся, поэтому увеличение количества ДНК следует рассматривать, как проявление полиплоидизации или (что функционально равнозначно) политенизации части ядер. Возможно, имеет место и амплификация генов. Увеличение это связано со становлением морфо-функциональной зрелости нейронов и обусловлено необходимостью обеспечения непрерывно возрастающей интенсивности белкового синтеза матричным материалом.

Ранее нами было показано, что в процессе первичной дифференцировки нейтральных клеток в эмбриогенезе происходят существенные изменения в содержании ДНК их ядер, приводящие к полиплоидизации части клеток [12, 13]. Было установлено, что полиплоидизируются клетки плащевого слоя (на примере переднеголового отдела ЦНС) во время миграции их из зоны синтеза ДНК эпендимы [11]. Однако в исследованных нами случаях основную массу полиплоидных клеток составляли клетки с содержанием ДНК, равным $4c$, поэтому возможность возврата их в митотический цикл [1, 5] оставалась не полностью исключенной. Тем более, что миграция G_2 -клеток в зону митозов и их деление на ранних этапах развития ЦНС является обычным процессом [6] и встречается даже на более поздних стадиях дифференцировки [11].

В связи с этим мы задались целью исследовать такую популяцию клеток, для которой вероятность сохранения пролиферативной активности исключалась бы полностью даже в эмбриогенезе. Выбор такой модели имел принципиальное значение, так как в случае выявления полиплоидных клеток в этих условиях можно было бы более объективно судить о предполагаемых нами связях между дифференцировкой эмбриональных клеток у позвоночных и их полиплоидизацией.

На основании литературных [16, 33] и собственных [8, 10] данных был сделан вывод о том, что популяция клеток Пуркинье мозжечка отвечает поставленным задачам: дифференцируясь из нейробластов к 10-м суткам развития куриного зародыша, клетки Пуркинье в дальнейшем в течение всей последующей морфо-функциональной дифференцировки и специализации не делятся. При этом идет интенсивный рост цитоплазмы и ядра, увеличиваются размер, число ядрышек, значитель-

но возрастает количество синтезируемого белка [8, 9]. Выбор данного объекта обуславливался еще и тем, что в ряде исследований была выявлена полиплоидизация значительной части клеток Пуркинье в постнатальном развитии [4, 35].

Материал и методика. Кусочки мозжечка эмбрионов кур* (10—21-е сутки) извлекали ежедневно (в одно и то же время), измельчали и инкубировали в 7% растворе поливинилпирролидона (15 мин), затем давленные препараты замораживали сухим льдом и фиксировали абсолютным спиртом [34]. Препараты окрашивали фуксином «Diamant» по Фельгену и определяли поглощение комплекса ДНК-фуксин на зондовом цитоспектрофотометре (калиброванный зонд больше ядра) двухволновым методом ($\lambda_1=565$ нм, $\lambda_2=498$ нм). Оптическую плотность и количество ДНК определяли по известным формулам и таблицам [28, 29]. Эталонном с известным содержанием ДНК для определения гаплоидного (n) и диплоидного ($2n$) эквивалента служили сперматиды петуха и клетки-зерна мозжечка. Фотометрия эталонных препаратов показала, что вариабельность количеств ДНК в измеренных клетках ниже 10% (рис. 1), а содер-

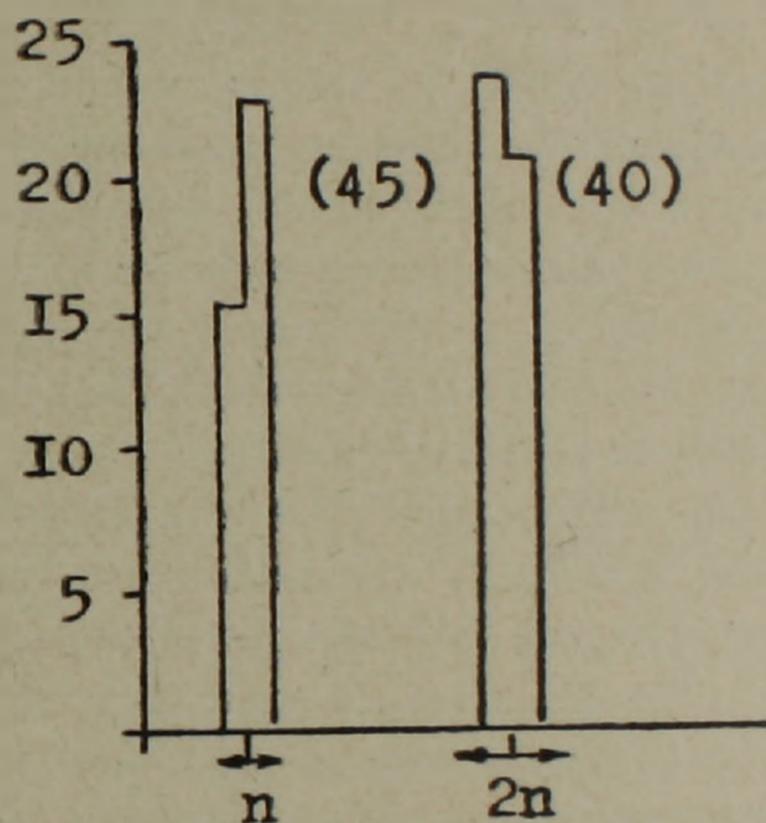


Рис. 1. Распределение количеств ДНК в ядрах сперматид и клеток—зерен мозжечка кур. В скобках указано число измеренных ядер. По горизонтали—плоидность ядер; по вертикали—число ядер. Классовый промежуток равен 10% от единицы плоидности.

жание ДНК строго соответствует n и $2n$. Все полученные данные обрабатывали статистически и выражали в условных сравнимых единицах. Для характеристики распределения количеств ДНК в отдельных ядрах использовали метод гистограмм (классовый промежуток равен 10% от единицы плоидности n)**.

Результаты и обсуждение. Из приведенной ниже таблицы видно, что содержание ДНК в ядрах клеток Пуркинье сохраняет относительное постоянство вплоть до 14-х суток развития, а затем начинает повышаться, превосходя к концу эмбриогенеза содержание ДНК в ядрах

* Подробное изложение методики получения эмбрионального материала дано в предыдущих сообщениях [8, 11].

** Остальные подробности методики фотометрии см. Магакян и Каралова [11].

Таблица
Среднее содержание и концентрация ДНК
в ядрах

Возраст эмбрионов, дни	Концентрация ДНК	Количество ДНК
10	0,090±0,002	6,66±0,15
11	0,088±0,001	6,51±0,05
12	0,087±0,001	6,40±0,05
14	0,098±0,004	6,96±0,21
15	0,109±0,003	7,25±0,29
16	0,097±0,005	9,45±0,47
17	0,105±0,006	10,30±0,60
18	0,097±0,004	9,45±0,38
20	0,106±0,005	10,50±0,52
21	0,109±0,005	10,68±0,31

клеток 10-ти суточных эмбрионов на 60%, при постоянстве ее концентрации

Увеличение количества ДНК и повышение вариабельности ее содержания в ядрах является, очевидно, выражением гетерогенности, проявляющейся в популяции клеток Пуркинье, начиная с 14-х суток. Действительно, именно в это время впервые появляются клетки с содержанием ДНК выше 2с (рис. 2), число которых в дальнейшем увеличивается одновременно с возрастанием количества ДНК до 4с и выше.

Ранее Бродским и Куш [2] было показано, что клетки Пуркинье крысят до 15-х суток постнатального развития являются диплоидными, тогда как у 3-х месячных животных большая часть клеток полиплоидна. Лефем с сотрудниками [18, 21—24] обнаружили тетраплоидию клеток Пуркинье в мозжечке человека, кошки и крысы. Зандриттер и др. [31, 35] показали, что полиплоидизация клеток Пуркинье у крыс происходит с 10-х по 30-е сутки развития, к этому времени все клетки становятся тетраплоидными и сохраняют 4с ДНК на всю жизнь. Наконец, Бродским и др. [4] было установлено, что удвоение содержания ДНК в клетках Пуркинье крыс происходит за очень короткий промежуток времени (10—13-е сутки). Этими же авторами впервые было выявлено включение N_3 -тимидина в ядра уже дифференцированных клеток Пуркинье. С помощью фотометрии ДНК в глыбках полового хроматина было показано также, что клетки Пуркинье выходят из цикла (после синтеза ДНК) в G_2 -периоде, хромосомы при этом не разделяются и сохраняют удвоенное количество ДНК в течение всей жизни [3].

Наряду с этим, некоторые авторы считают, что клетки Пуркинье даже у взрослых крыс диплоидны [30], хотя анализ фактических данных, приводимых в работе, говорит об очень большой вариабельности количеств ДНК в разных ядрах (более 35%). В исследованиях Лодина с сотрудниками, проведенных на мышах, были получены неадекватные результаты при использовании различных методов определения количества ДНК: цитофотометрия показала наличие полиплоидии [27], а биохимический анализ фракции клеток Пуркинье, по мнению авторов, не под-

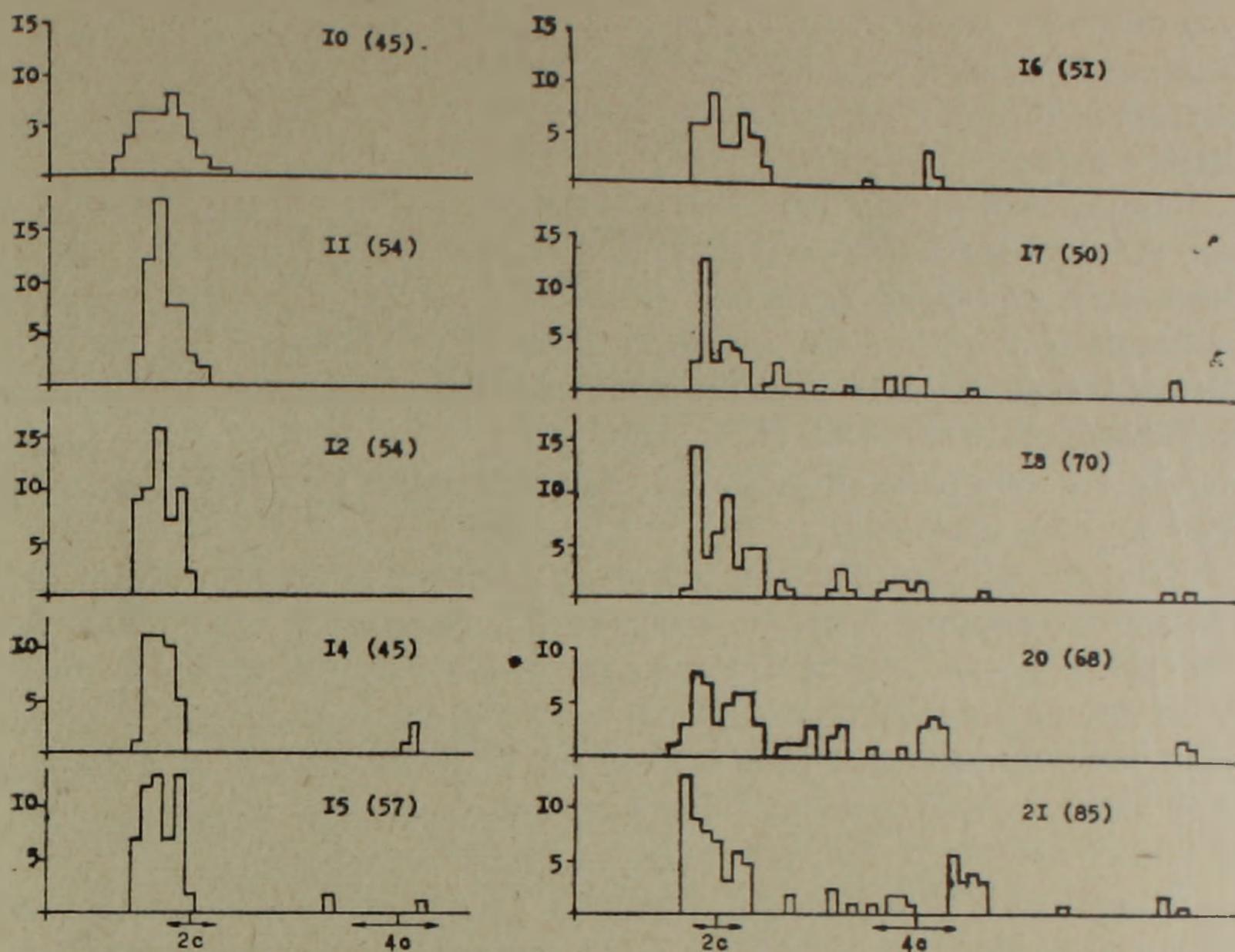


Рис. 2. Распределение количеств ДНК в ядрах клеток Пуркинье мозжечка эмбрионов кур. Над каждой гистограммой указан возраст эмбрионов и число измеренных ядер (в скобках). Остальное как на рис. 1.

твердил результатов фотометрии [19]. Однако, несмотря на известные затруднения, связанные с фотометрией объектов малой оптической плотности [20], мы склонны считать более достоверными цитофотометрические данные, так как биохимическое определение содержания ДНК неизбежно усредняет значения количеств вещества для разных вариантов. Между тем на вариабельность этого показателя указывают не только наши и приведенные выше данные других авторов, но и результаты биохимического анализа, проведенного Лодиным с сотрудниками: различия между усредненными значениями количеств ДНК в разных сериях опытов достигают 25% [19].

Данных о содержании ДНК в клетках Пуркинье мозжечка у кур в известной нам литературе обнаружить не удалось.

Сравнение данных, полученных в различных лабораториях, свидетельствует о противоречивости результатов не только в связи с использованием различных методов. Даже анализ материала, полученного с помощью фотометрии, показывает довольно большой разброс в сроках и продолжительности самого процесса полиплоидизации клеток Пуркинье у одного и того же вида животных (у крыс). Вероятно, это связано с состоянием животных в момент взятия материала для исследования [4]. Наблюдаются различия и в характере полиплоидизации: Бродским и др. [4] выявлена большая синхронность в протекании этого процесса (за два дня практически вся популяция клеток Пуркинье стано-

вится тетраплоидной), в то время как измерения Зандриттера и др. [35] обнаружили значительную продолжительность перехода популяции клеток Пуркинье из диплоидного состояния в тетраплоидное, при этом в течение 15 суток наблюдались промежуточные значения содержания ДНК в ядрах.

Наши данные (рис. 2) свидетельствуют о том, что процесс увеличения содержания ДНК в ядрах клеток Пуркинье у эмбрионов кур приближается по своему характеру к описанному Зандриттером и др. [35], за исключением того, что вплоть до окончания эмбриогенеза мы не наблюдали перехода всех (или по крайней мере большинства) клеток в тетраплоидное состояние. Возможно, что у кур этот процесс продолжается в постнатальном развитии. Так или иначе растянутость процесса во времени очевидна.

Сохранение относительно большого количества диплоидных клеток в популяции можно объяснить миграцией из зернистой зоны в ганглиозный слой молодых клеток Пуркинье, отмеченной нами ранее [8], в отличие от других авторов, не наблюдавших такой миграции [6, 14, 15] в мозжечке млекопитающих. Это тем не менее не решает вопроса о растянутости процесса и появления промежуточных значений количеств ДНК во многих клетках (гипердиплоидия и гипертетраплоидия).

Возможно, что описанный характер распределения является отражением амплификации генов (т. е. «частичной полиплоидизации») [17] в целях увеличения транскрипционной способности отдельных локусов генома, находящей свое выражение в некротном нарастании количества ДНК в части клеток и в активации ядрышкового аппарата [8]. Во всяком случае такую возможность нельзя исключить, тем более, что некоторые авторы склонны считать амплификацию генов вполне вероятным и даже необходимым условием дифференцировки клеток в эмбриогенезе [25, 26]. Выявленное нами ранее [12, 13] увеличение содержания ДНК в ядрах клеток презумптивных тканей куриных зародышей с характерной при наличии промежуточных значений количеств ДНК «размытостью» гистограмм весьма сходно с динамикой ДНК, описанной указанными авторами для клеток зачатковых тканей зародышей тритона, и в настоящее время также может рассматриваться как следствие амплификации генов, вероятно, имеющей место и после того, как содержание ДНК в ядрах клеток достигает значений 4с. Наличие гипертетраплоидных ядер в популяции клеток Пуркинье (рис. 2) свидетельствует в пользу этого предположения.

Установленное нами увеличение содержания ДНК в ядрах клеток Пуркинье совпадает по времени с началом проявления и дальнейшим развитием специфических морфологических [8] и функциональных [9, 32] признаков, характеризующих зрелость этих клеток и мозжечка в целом у эмбрионов кур. Существенно, что это нарастание количества ДНК в ядрах несколько опережает интенсификацию синтеза белка и увеличение содержания РНК в цитоплазме, наблюдающиеся в период резкого возрастания размеров клеток Пуркинье к концу эмбриогенеза

кур [8, 9]. Следовательно, полиплоидизация нейронов (возможно, амплификация генов) не может в данном случае рассматриваться как следствие гипертрофии клеток. Скорее наоборот, усиленный рост и становление функциональной зрелости клеток Пуркинье обуславливаются активацией генома и всей последующей цепи синтеза белков.

Таким образом, в основе полиплоидизации эмбриональных клеток, в отличие от аналогичного явления, имеющего место при регенерации органов или при старении организма, лежат иные факторы: не реактивного, а конститутивного порядка. Иначе говоря, полиплоидизация клеток в эмбриогенезе есть результат реализации программы нормального развития, а не следствие реакции системы на функциональную гипертрофию клеток при разного рода патологиях.

Институт зоологии
АН АрмССР

Поступило 15.1 1974 г.

Յու. Հ. ՄԱՂԱՔՅԱՆ, Ե. Մ. ԿԱՐԱՎՈՎԱ

ԷՄԲՐԻՈԳԵՆԵՏԻՍԿ ԿՈՐԻՉՆԵՐԻ ԴՆԹ-Ի ՔԱՆԱԿԻ ԵՎ ԲՋԻՉՆԵՐԻ
ՄՈՐՖՈՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿ ԴԻՖՖԵՐԵՆՑՄԱՆ ԵՎ ՄԱՍՆԱԳԻՏԱՑՄԱՆ
ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հա՛վերի էմբրիոնների (զարգացման 10—21-րդ օր) ուղեղիկի Պուրկինեի բջիջների օրինակի վրա, որոնք օգտագործված են որպես մոդել, ցիտոսպեկտրոֆոտոմետրիկ մեթոդով ցույց է տրված, որ նրանց կորիզներում ԴՆԹ-ի պարունակությունը ավելանում է (միջինը 60), ԴՆԹ-ի խտության միևնույն մակարդակը պահպանելու դեպքում: Սա կատարվում է բջիջների պոպուլյացիայում առաջացած հիպերպլոիդ, տետրապլոիդ և հիպերտետրապլոիդ ԴՆԹ-ի քանակության գոյացման հաշվին: Քանի որ Պուրկինեի բջիջները չեն կիսվում, ուստի ԴՆԹ-ի քանակի ավելացումը պետք է դիտել որպես կորիզների մի մասի պոլիպլոիդիզացիայի կամ (որ ֆունկցիոնալ համարժեք է) պոլիտենիզացիայի արտահայտման երևույթ: Չի բացառվում, որ տվյալ դեպքում տեղի է ունենում նաև գենների ամպլիֆիկացիա: ԴՆԹ-ի քանակի ավելացումը օրինաչափ է ինտենսիվ աճող նեյրոնների մորֆո-ֆունկցիոնալ հասունացմանը և պայմանավորված է սկզբնանյութով սպիտակուցային սինթեզի անընդհատ աճող ինտենսիվության ապահովման անհրաժեշտությամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бродский В. Я., Квинихидзе Г. С., Магакян Ю. А., Урываева И. В. и Каралова Е. М. Цитология, 13,4:522—525, 1971.
2. Бродский В. Я. и Куц А. А. ДАН СССР, 147:713—716, 1962.
3. Бродский В. Я. и Резников К. Ю. ДАН СССР, 202,5:1193—1195, 1972.
4. Бродский В. Я., Соколова Г. А. и Манакова Т. Е. Онтогенез, 2,1:33—36, 1971.
5. Бродский В. Я. и Урываева И. В. Онтогенез, 1, 3:229—247, 1970.

6. Гаврилова Т. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, 67, 7:1014—1019, 1967.
7. Грачева Н. Д. Авторадиография синтеза нуклеиновых кислот и белков в нервной системе, Л., 1968.
8. Каралова Е. М. и Магакян Ю. А. Основные факторы полиплоидизации клеток Пуркинье мозжечка в эмбриогенезе кур. I. Характеристика морфологической дифференцировки и роста клеток Пуркинье. Цитология, 1974 (в печати).
9. Каралова Е. М. и Магакян Ю. А. Основные факторы полиплоидизации клеток Пуркинье мозжечка в эмбриогенезе кур. II. Изменения в содержании и концентрации белков, белковых sH-групп и РНК в цитоплазме клеток Пуркинье в процессе их дифференцировки и специализации. Цитология, 1974 (в печати).
10. Магакян Ю. А. и Каралова Е. М. В сб. Механизмы регул. функции клеточн. ядра. Тбилиси: 77—78, 1972.
11. Магакян Ю. А. и Каралова Е. М. Цитология, 15, 7:888—898, 1973.
12. Магакян Ю. А., Макарян С. Р., Каралова Е. М. и Медведова Н. А. ДАН АрмССР, 49, 5:277—280, 1969.
13. Магакян Ю. А., Моркарян Р. Н. и Петросян А. В. Цитология, 11, 3:335—347, 1969.
14. Altman J. & Das G. D. Nature, 207:953—956, 1965.
15. Altman J. & Das G. D. J. Compar. Neurol., 126:337—390, 1966.
16. Buffoni G. M. & D'Ancona G. Rend. Acc. Naz. Lincei, (S, 8), 26:1—7, 1959.
17. Brown D. D. & Dawid I. B. Science, 160:272—280, 1968.
18. Herman Ch. J. & Lapham L. W. Brain Res., 15:35—48, 1969.
19. Cohen J., Mares V. & Lodin Z. J. Neurochem., 20:651—657, 1973.
20. Garcia A. M. & Iorio R. In „Introduction to Quant. Cytochem“, N. Y.—L.: 178—193, 1966; M.: 179—194, 1969.
21. Lapham L. W. Proc. 5th inter. Congr. neuropathol. Zürich, 445—449, 1965.
22. Lapham L. W. Science, 159:310—311, 1968.
23. Lentz R. D. & Lapham L. W. J. Neurochem., 16, 3:379—384, 1969.
24. Lentz R. D. & Lapham L. W. J. Neuropathol. Exper. Neurol., 29, 1:43—56, 1970.
25. Lohmann K. Roux' Archiv, 169:1—40, 1972.
26. Lohmann K. & Vahs W. Experientia (Basel), 25:1315—1316, 1969.
27. Mares V., Lodin Z. & Sàcha J. Physiol. bohemosl., 21, 1:98—99, 1972.
28. Mendelsohn M. L. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4:415—424, 1958.
29. Mendelsohn M. L. J. Biophys. Biochem. Cytol., 11:509—513, 1961.
30. Morselt A. F. W., Braakman D. J. & James J. Acta Histochem., 43:281—286, 1972.
31. Novakova V., Sandritter W. & Schlueter G. Exper. Cell. Res., 60:454—456, 1970.
32. Peters J., Vonderahe A. & Huesman A. Physiol. Zool., 33:225—231, 1960.
33. Ramon-y-Cajal S. R. Studies on vertebrate neurogenesis. Springfield (Illinois), 1960.
34. Sandritter W., Pilny J., Novakova Y. & Kiefer G. Histochemie, 7:1—7, 1966.
35. Sandritter W., Novakova V., Pilny J. & Kiefer G. Z. Zellforsch., 80:145—152, 1967.