

УДК 576.3:591.465.1:595.752

СИНТЕЗ И НАКОПЛЕНИЕ ДНК В ЯДРЕ ООЦИТА В ФОЛЛИКУЛЯРНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ ОВАРИОЛЫ АРАРАТСКОЙ КОШЕНИЛИ

Ю. А. МАГАКЯН, Е. М. КАРАЛОВА, М. Г. ХАЧАТРЯН

С помощью радиоавтографии и цитофотометрии исследовали синтез и накопление ДНК в ядре ооцита кошенили во время его цито- и трофоплазматического роста. Установлено, что в течение всего этого времени в ядро включается ^3H -тимидин. Активное включение ^3H -тимидина в ядро ооцита сопровождается значительным увеличением содержания ДНК в ядре. Столь активный синтез и накопление ДНК не свойственны животным, обладающим нутриментарным типом оогенеза и активно функционирующими в это же время трофоцитами. Обсуждаются вопросы о природе синтезированной ДНК и механизмах регуляции синтеза дополнительной ДНК в системе «ооцит—трофоцит».

В ранее опубликованных сообщениях на основании цитоморфологических [7] и радиоавтографических [10] данных было показано, что ядро ооцита кошенили обладает высокой РНК-синтезирующей активностью в период цито- и трофоплазматического роста. Вместе с тем известно, что ооциты животных, имеющих политрофную (см. обзоры: [2, 4]), или политрофно-фолликулярную [5] структуру овариол, не проявляют, за редкими исключениями, активности в синтезе РНК и других веществ, накапливающихся в ооплазме. Напротив, это явление характерно для животных с солитарным или фолликулярным типом оогенеза при отсутствии трофоцитов и, как правило, в этом случае столь высокая интенсивность синтеза РНК и других веществ сопровождается синтезом и накоплением в ядре ооцита дополнительной экстрахромосомной ДНК [4]. В связи с изложенным нами был поставлен вопрос: имеет ли место аналогичное явление в ооцитах кошенили или высокая РНК-синтезирующая активность обеспечивается возрастанием скорости процессов транскрипции? Для решения этого вопроса были предприняты радиоавтографическое и цитофотометрическое исследования синтеза и содержания ДНК в ядре ооцита кошенили, результаты которого излагаются в настоящем сообщении.

Материал и методика. Яичники личинок и половозрелых самок кошенили извлекали в 0,75%-ном (изотоническом) растворе NaCl, переносили в аналогичный раствор, содержащий ^3H -тимидин (уд. акт. 5,6 Ки/ммоль, конечная концентрация в растворе 50 мКи/мл), инкубировали при 26° в течение 1 ч, фиксировали в смеси формалин—этанол—уксусная кислота (ФСУ, 9:3:1), готовили парафиновые срезы (5 мкм), препараты покрывали эмульсией типа «М» (НИИХИМФОТОПРОЕКТ), экспонировали

14 сут. проявляли стандартным способом и окрашивали гематоксилином по Майеру и эозином. Устанавливали наличие метки и характер ее распределения в ядре ооцита и фотографировали.

Количество ДНК на ядро ооцита определяли на срезах (5 мкм) после фиксации в ФСУ, гидролиза в 1 н HCl (10 мин, 60°) и окраски фуксином (Diamant) по Фельгену. Измерения проводили на зондовом цитофотометре двухволновым методом (λ_1 565 нм, λ_2 498 нм), по таблице определяли среднюю оптическую плотность [1] и вычисляли массу ДНК-фуксина (услов. ед.). Данные обрабатывали статистически. Определяли также коэффициент прироста массы по методу Майнотта ($a_1/a = Q_n\%$, где a_1 —большая, a —меньшая массы). Измерения проводили (по 50—60 ядер) на каждой из пяти стадий, на которые подразделяется фолликулярный период развития овариолы кошенили [9].

Результаты и обсуждение. Согласно данным радиоавтографии, ^3H -тимидин интенсивно включается в ядро ооцита на всех стадиях фолликулярного периода развития овариолы кошенили (рис. а-е). На ста-

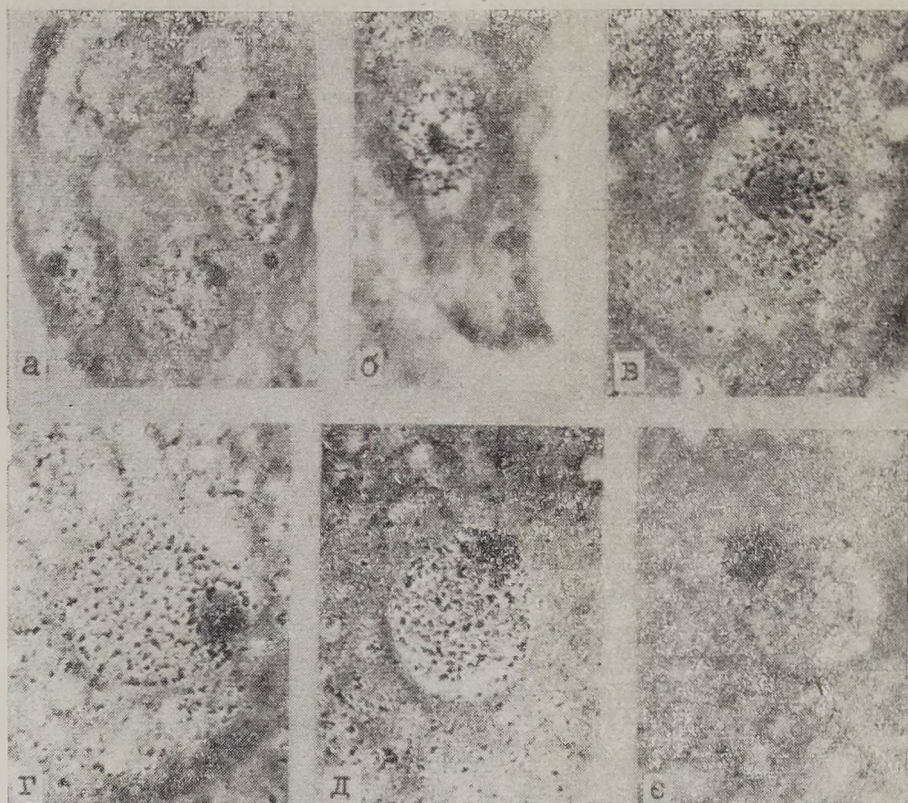


Рис. Изменения в интенсивности включения ^3H -тимидина в ядро ооцита кошенили и в характере распределения метки. а—включение ^3H -тимидина в цитоститы, в отдельных случаях метка повторяет очертания хромосом и включается в скользящую зону. б—включение метки в ядро ооцита на I стадии; в—е—то же на II (в), III (г), IV (д) и V (е) стадиях, концентрация метки в зоне околоядрышкового хроматина, постепенное передвижение ядрышка к периферии ядра и экструдия его в оплазму. Окраска: гематоксилином по Майеру и эозином. Увел.: об. 100 $\times$, ок. 12,5 $\times$.

дин цисточитов (на грани дофолликулярного и фолликулярного периодов, рис. а) и на I стадии фолликулярного периода (рис. б) метка включается по всему ядру, местами повторяя очертания хромосом. В ядрышко (размеры которого пока еще невелики) ^3H -тимидин не включается, но уже на этих ранних стадиях обнаруживается тенденция к концентрации метки вокруг ядрышка, т. е. в зоне околядрышкового хроматина (рис. а, б). В дальнейшем, в процессе увеличения размеров ядра и ядрышка, интенсивность мечения ядра увеличивается, одновременно с этим возрастает количество и величина гранул восстановленного серебра над зоной околядрышкового хроматина (рис. в, г). Ядрышко, покинув расположение в центре ядра, постепенно перемещается к периферии его, увлекая вместе с собой ободок меченного ^3H -тимидином хроматина (рис. г, д). На остальной площади ядра метка располагается более или менее равномерно. В конце оогенеза (во время вителлогенеза) ядрышко вместе с окружающей его меткой выводится в ооплазму (рис. е).

Концентрация ^3H -тимидиновой метки в районе околядрышкового хроматина и экструзия вместе с ядрышком в ооплазму—явления, характерные для амплификации рДНК. Факты выхода целых ядрышек из ядра в ооплазму были известны давно, однако долгое время их считали артефактами, связанными с гистологической обработкой препаратов [3]. В настоящее время можно с уверенностью считать эти факты доказанными, так как с помощью электронной микроскопии удалось проследить весь процесс выхода ядрышек в ооплазму путем разрыва значительной части ядерной оболочки [15, 16]. Наши светооптические данные также подтверждают это, что на современном этапе изучения амплификации ДНК и способов вывода дополнительного матричного материала за пределы ядра представляет немалый интерес. Однако наибольший интерес представляет сам факт синтеза дополнительной ДНК, обнаруженный нами у животного с нутриментарным типом оогенеза, при котором у подавляющего большинства изученных видов ядро ооцита вообще неактивно [4]. Важно отметить, что и в этом у кошенили обнаруживается много особенностей, отличающих ее от других видов.

Так, наличие одного, даже крупного, ядрышка в ядре ооцита служит показателем отсутствия избытка рДНК [17]. Если вокруг одиночного ядрышка и образуется кольцо гетерохроматина, включающее ^3H -тимидин, то это происходит лишь на самых ранних этапах оогенеза, и такие ядрышки никогда не утрачивают связи с хромосомами [11]. Есть, однако, исключения из этого «правила»: у некоторых насекомых, как и у кошенили, на протяжении всего оогенеза сохраняется одиночное ядрышко, содержащее амплифицированную рДНК [12]. Обычно же амплификация рДНК ведет к образованию в ядре многочисленных микроядрышек [14]. Микроядрышки у кошенили не образуются (их не следует смешивать с ядрышкоподобными образованиями), но к концу оогенеза от крупного ядрышка нередко отпочковывается 1—3 более мелких [7].

Таким образом, наши данные позволяют полагать, что в ядре ооцита кошенили в период цито- и трофоплазматического роста происходит амплификация рДНК, однако по этому признаку, также как и по многочисленным другим, кошениль занимает в определенном смысле «промежуточное» положение по типу оогенеза между солитарным и нутриментарным [7—10].

Наличие синтеза дополнительной ДНК в ядре ооцита кошенили и ее накопление подтверждаются данными цитофотометрии, согласно которым количество ДНК в ядре непрерывно возрастает в течение фолликулярного периода, увеличивая свою массу в 17 раз (таблица). При этом обнаруживается, что наибольшее накопление массы ДНК приходится на периоды пре- и вителлогенеза (II—IV стадии).

Таблица

Содержание (услов. ед.) и интенсивность прироста массы (%)
ДНК в ядре ооцита кошенили

Показатели	Стадии развития				
	I	II	III	IV	V
Содержание ДНК	3,1 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,8	8,0 $\pm$ 0,8	23,0 $\pm$ 2,0	52,0 $\pm$ 1,0
Коэффициент интенсивности прироста массы	100	213	106	287	226

Интенсивность этого процесса также неодинакова на разных стадиях: в течение I стадии количество имевшейся к началу стадии ДНК увеличивается в два с лишним раза, затем интенсивность ее прироста снижается почти до исходного уровня, в течение III стадии происходит почти трехкратное умножение ее массы и некоторый спад к концу оогенеза (таблица).

Сравнение этих данных с результатами цитофотометрии количества ДНК в ядрах трофоцитов [6] показывает, что между периодами активации накопления ДНК и его торможения в ооците и трофоцитах существует обратная зависимость. Наличие ее позволяет нам сделать вывод о том, что в системе «ооцит—трофоциты» существует некий надклеточный механизм регуляции синтеза и накопления ДНК в ядрах этих клеток. Обычно в овариолах, развивающихся по нутриментарному типу, действие указанного механизма проявляется в полном или очень раннем подавлении ДНК- и РНК-синтезирующей активности в ядре ооцита и в максимальной интенсификации этих процессов в трофоцитах [12]. У кошенили же, занимающей промежуточное положение между солитарным и нутриментарным типами оогенеза, проявляется большая гибкость в работе этого механизма регуляции. На основании сказанного мы считаем возможным рассматривать систему «ооцит—трофоциты» как бинарную, в которой функции одного из элементов находятся в четкой зависимости от степени выраженности функциональной активности другого [5].

Итак, наши данные свидетельствуют о том, что в ядре ооцита ко-
шенили активизируются процессы репликации дополнительной ДНК, что
при наличии интенсивно функционирующих трофоцитов представляет
собой чрезвычайно редкое явление. По всей вероятности, избыток ДНК
и РНК является результатом амплификации р-генов, однако для окон-
чательного выяснения природы синтезируемых нуклеиновых кислот тре-
буется проведение гибридизационных исследований (комплементарно-
сти различных типов ДНК и РНК in situ).

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 30.VIII 1979 г.

ԶՎԱՐՋՁԻ ԿՈՐԻՉՈՒՄ ԴՆԹ-Ի ՍԻՆԹԵԶԸ ԵՎ ԿՈՒՏԱԿՈՒՄԸ ՈՐԴԱՆ ԿՍՐՄՐԻ ՕՎԱՐԻՈՒԼԻ ԶԱՐԳԱՅՄԱՆ ՖՈԼԻԿՈՒԼԱՐ ԺԱՄԱՆԱԿԱՇՐՋԱՆԻ ԸՆԹԱՅՔՈՒՄ

Յու. Հ. ՄԱԳԱԿԻԱՆ, Ե. Մ. ԿԱՐԱՎՈՎԱ, Մ. Գ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

Ռադիոավտոգրաֆիայի և ցիտոֆոտոմետրիայի օգնությամբ ուսումնա-
սիրվել են որդան կարմրի ձվաբջջի կորիզում ԴՆԹ-ի սինթեզը և կուտակումը,
նրա ցիտո-և տրոֆոպլազմատիկ աճի ընթացքում:

Հաստատվել է, որ լայն ամբողջ ժամանակի ընթացքում կորիզի մեջ է
ներառված ^3H -թիմիդինը: Սկզբում նշանը տեղադրվում է հիմնականում քրո-
մոսոմներից վերև, իսկ հետագայում քիչ թե շատ հավասարապես տարած-
վում է կորիզի ամբողջ մակերեսով: Ձվաբջջի դարդացման հենց սկզբից և
ընդհուպ մինչ օգենեզի ավարտումը բացակայում է նշանի ներառումը կորի-
զի մեջ, բայց միաժամանակ նկատվում է նշանի ակտիվ ներառումը մերձկո-
րիզակային քրոմատինի մեջ, որը օգենեզի վերջում կորիզակի հետ միասին
դուրս են բերվում ձվաբջջի պլազմայի մեջ: ^3H -թիմիդինի ակտիվ ներառումը
ձվաբջջի կորիզի մեջ ուղեկցվում է կորիզում ԴՆԹ-ի պարունակության զգալի
ավելացումով, որը ավելանում է 17 անգամ: ԴՆԹ-ի այսպիսի ակտիվ սինթեզը
և կուտակումը հատուկ չէ այն կենդանիներին, որոնք ունեն օգենեզի նուորի-
մենուար տիպ և այդ ժամանակ ակտիվ գործող սնող բջիջներ: Քննարկվում
են սինթեզվող ԴՆԹ-ի էություն և լրացուցիչ ԴՆԹ-ի սինթեզի մեխանիզմի կա-
նոնավորման հարցերը «ձվաբջիջ-սնող բջիջ» համակարգում:

DNA SYNTHESIS AND ACCUMULATION IN THE OOCYTE NUCLEUS DURING THE FOLLICULAR PERIOD OF OVARIOLE DEVELOPMENT IN ARARAT COCHINEAL

Yu. A. MAGAKIAN, E. M. KARALOVA, M. G. KHACHATRIAN

The synthesis and accumulation of DNA in the oocyte nucleus of
cochineal was investigated by radioautography and cytophotometry du-
ring its cyto- and trophoplasmatic growth. It was established that during
all this time ^3H -thymidine is included in the nucleus. At the beginning
the label is noted mainly over the chromosomes, and then it is distribu-
ted more or less uniformly all over the nucleus surface. At the very
beginning of the oocyte development and until the completion of the

oogenesis the inclusion of the label in the nucleolus is not detected. The active inclusion of ^3H -thymidine in the oocyte nucleus is accompanied by a significant increase of DNA content in the nucleus, an increase in 17 times. Such an active synthesis and accumulation of DNA is not peculiar to animals, having a nutritimentary type of oogenesis and actively functioning trophocytes. The problems of the nature of the synthesized DNA and the regulation mechanisms of the supplementary DNA synthesis in the "oocyte—trophocytes" system are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агроскин Л. С., Папаян Г. В. Цитофотометрия. Л., 1977.
2. Айзенштадт Т. Б. В кн.: Современные проблемы оогенеза. 5, М., 1977.
3. Вильсон Э. Клетка и ее роль в развитии и наследственности. 1, М.—Л., 1936.
4. Грузова М. Н. В кн.: Современные проблемы оогенеза. 51, М., 1977.
5. Магакян Ю. А. Биолог. ж. Армении, 32, 4, 279, 1979.
6. Магакян Ю. А., Каралова Е. М., Хачатрян М. Г. Цитология, 21, 5, 548, 1979.
7. Магакян Ю. А., Макарян С. Р., Акопян Л. А., Петросян А. В. Биолог. ж. Армении, 32, 11, 1979.
8. Магакян Ю. А., Макарян С. Р., Петросян А. В., Мкртчян Л. П., Аброян Л. О., Акопян Л. А. Цитология, 18, 8, 932, 1976.
9. Хачатрян М. Г., Акопян Л. А., Петросян А. В., Каралова Е. М., Макарян С. Р., Магакян Ю. А. Цитология, 21, 4, 382, 1979.
10. Хачатрян М. Г., Каралова Е. М., Магакян Ю. А. Биолог. ж. Армении, (в печати).
11. Bal A. K., Lubinville F., Cousineau G. H. In: The nucleus, 244, N. Y.—London, 1968.
12. Cave M. D. J. cell biol., 66, 461, 1975.
13. Cave M. D., Allen E. R. J. morphol., 142, 379, 1974.
14. David I. B., Brown D. D. Devel. biol., 22, 1, 1970.
15. Jaworska H., Lima-de-Faria A. Hereditas, 74, 187, 1973.
16. Sasha K. Devel. biol., 12, 248, 1965.
17. Vincent W. S., Halvorsen H. O., Chen H. R., Shin D. Exptl cell res., 57, 240, 1969.