

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ РУССКОЙ МЫСЛИ

ТОМ 6

---

---

Е. Н. ХАЧАТУРОВ

ЭЛИМИНАЦИЯ  
ЗНАЧИТЕЛЬНОЙ ЧАСТИ ДНК  
ПРИ СМЕНЕ ЯДЕРНЫХ ФОРМ  
В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ  
РАЗВИТИЯ ОРГАНИЗМОВ

МОСКВА  
«Общественная польза»  
1995

**ЭНЦИКЛОПЕДИЯ РУССКОЙ МЫСЛИ**

**ТОМ 6**

---

---

**Е. Н. ХАЧАТУРОВ**

**ЭЛИМИНАЦИЯ  
ЗНАЧИТЕЛЬНОЙ ЧАСТИ ДНК  
ПРИ СМЕНЕ ЯДЕРНЫХ ФОРМ  
В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ  
РАЗВИТИЯ ОРГАНИЗМОВ**

**МОСКВА**

**«Общественная польза»**

**1995**

**УДК575.17; 577.21; 61:575**

Издание выходит с 1993 г.

Ответственный за выпуск В. Г. Родионов  
(главный редактор журнала «Русская мысль»)

Энциклопедия Русской Мысли: Русское Физическое Общество. Издательство «Общественная польза»: — М.: Общ. польза, 1993 — — ISBN 5-85617-100-4.

Т. 6: (Е. Н. Хачатуров. Элиминация значительной части ДНК при смене ядерных форм в жизненном цикле развития организмов). — 1995. — 140 с. — ISBN 5-85617-006-7.

Шестой том «Энциклопедии Русской Мысли», — монография Евгения Николаевича Хачатурова, кандидата биологических наук (1968г.), — посвящена описанию и обсуждению обнаруженного автором явления элиминации половины количества ДНК из ядер молодых сперматид в процессе их превращения в ядра зрелых сперматозоидов.

С применением морфологического, цитохимического и цитофотометрического методов исследования обнаружено, что в норме у млекопитающих в результате двух последовательных делений мейоза образуется четыре гаплоидных сперматиды, из ядер которых в процессе образования зрелых сперматозоидов элиминируется половина количества ДНК, а у представителей классов птиц, пресмыкающихся, земноводных, рыб, моллюсков и насекомых из сперматоцита I-го порядка образуется в норме не четыре, а только два гаплоидных сперматозоида, при этом половина количества ДНК, содержащегося в ядре сперматоцита I-го порядка элиминируется на том или ином этапе деления мейоза.

Это явление, по мнению автора, носит универсальный характер и возникло в процессе эволюции как приспособление для сохранения биологических видов, свидетельствуя о существовании презиготной селекции, То есть отбора на уровне гамет.

Автор предостерегает, что явление элиминации значительной части ДНК при смене ядерных форм в жизненном цикле развития организмов, как всякий приспособительный признак, имеет конечный запас прочности, и пренебрегать этим обстоятельством – значит подвергать риску само существование отдельных биологических видов, в том числе и человека.

Монография содержит многочисленные экспериментальные микрофотографии и таблицы, а также обширную библиографию по теме.

Монография предназначена для широкого круга научных работников естественнонаучного профиля: биологов, медиков, биофизиков, генетиков, а также философов и специалистов по медицинской генетике, геной инженерии, селекционеров, экологов.

**ISBN 5-85617-006-7**  
(Т. 6)

© Энциклопедия Русской  
Мысли, 1995

Издательство Русского

**ISBN 5-85617-100-4**

© Физического Общества  
«Общественная польза», 1995

© Хачатуров Е. Н., 1995

## ОТ АВТОРА

Предлагаемая читателю работа была подготовлена к печати в 1978 году. По далёким от науки и независимым от автора причинам она не была опубликована. Работа публикуется в первоначальном виде, лишь с небольшой редакционной правкой.

Исследования, предпринятые в 1971 году, как чисто методические, с целью выяснения некоторых спорных вопросов количественной цитохимии ДНК, через несколько лет работы привели к открытию **явления элиминации значительной части ДНК при смене ядерных форм в жизненном цикле развития организмов**, – явления неизвестного до сих пор в клеточной биологии и генетике.

Когда сам факт существования в природе явления презиготной селекции стал для меня очевиден, не менее очевидным стало и то, что это явление возникло в процессе эволюции в качестве эффективной защиты популяций отдельных видов организмов от мутационного давления окружающей среды. Стало очевидным также, что испытывать этот защитный механизм на прочность, продолжая разрушать устоявшуюся за миллионы лет экологическую обстановку, в которой существовали организмы, и в том числе люди, чрезвычайно опасно, так как в случае отказов в механизме презиготной селекции (когда в клетках организмов повреждаются, мутируют оба аллеля того или иного гена; и отбор генетического материала становится бессмысленным) может начаться **генетическая катастрофа**.

Когда была завершена предлагаемая читателю работа (это было всего лишь 17 лет назад) мне представлялось, что своим достаточно хорошим здоровьем, несмотря на загрязнение окружающей среды, современное поколение

молодых людей обязано и существованию презиготной селекции.

Тогда я, как и многие другие, не предполагал, что впереди нас ждёт авария в Чернобыле, тогда мы ничего не знали об озере радиоактивной воды на Южном Урале, тогда ещё количество автомобилей, отравляющих всё живое, не достигло астрономической величины, тогда околоземное пространство ещё не было превращено в свалку металлолома, тогда ещё было Аральское море, в котором водилась рыба, тогда ещё над хлопкосеющими районами Средней Азии в сезон сбора хлопка не стоял месяцами стойкий смог, насыщенный дефолиантами, грозящий генетическим вырождением целым народам, тогда отравление воды и пахотных земель минеральными удобрениями, гербицидами, инсектицидами и свинцом только начиналось, тогда я всего в 20-ти километрах от Москвы в реке Десне мог запросто набрать для исследований сколько угодно беззубок, которые могут жить только в очень чистой воде. Многого мы тогда не знали и не предполагали, а если, что знали и наблюдали, то всё казалось ещё легко исправимым.

Резкое увеличение в последние 9–10 лет среди новорождённых числа врождённых физических уродств, врождённых лейкозов и иммунных нарушений свидетельствует о том, что механизм презиготной селекции даёт сбой, и мы оказались в условиях генетической катастрофы.

Сегодня на смену гонке вооружений, на которую мы растранижили окружающий нас мир, приходит не менее опасная глобальная авантюра, которую журналисты очень точно назвали «гонкой разоружения». Непродуманные и поспешные действия при уничтожении вооружения, в том числе и атомного, могут привести к окончательному разрушению окружающей среды. Кроме того, нам никто не давал права уничтожать такие энергоёмкие вещества, как расщепляющиеся материалы (плутоний, уран-235 и т. п.)

или такие высокоэнергозатратные вещества как тяжёлая вода, титан, алюминий и т. п., ради производства которых мы уничтожили окружающий нас биогеоценоз.

Речь сегодня должна идти не об уничтожении или захоронении таких материалов, а о их консервации и сохранении для будущих поколений, которые с развитием знаний смогут им найти полезное применение.

Сегодня речь идёт уже не об охране или защите окружающей среды, а о её восстановлении. Дезинтеграция СССР поставила под сомнение возможность выполнения серьёзных экологических программ по восстановлению биогеоценоза целых регионов нашей страны, от выполнения которых уйти уже нельзя, но выполнить которые можно только всем миром.

*Е. Хачатуров*

Москва, июль 1992 г.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящей монографии представлены результаты исследований сперматогенеза и спермиогенеза у целого ряда видов животных, проводимых в различное время в течение семи лет (1971–1977 г.г.).

Первоначально работа была предпринята как чисто методическая, с целью выяснить причину снижения вдвое связывания красителя ядрами зрелых сперматозоидов у млекопитающих по сравнению с ожидаемым для гаплоидных ядер при окрашивании ядер по методу Фельгена с тем, чтобы с помощью тех или иных химических воздействий исправить этот, как вначале казалось, «артефакт» окрашивания по методу Фельгена.

Дело в том, что к этому времени было опубликовано большое число работ, посвящённых явлению снижения окрашиваемости ядер зрелых сперматозоидов млекопитающих (при выявлении ДНК в ядерных структурах по методу Фельгена и методу галлоцианин-хромовые квасцы) по сравнению с ожидаемой и действительно наблюдаемой в гаплоидных ядрах молодых сперматид. Упомянем здесь только некоторые, наиболее характерные, по нашему мнению, работы, посвящённые этой проблеме.

Ослабление интенсивности окраски почти вдвое у сперматозоидов мыши, по сравнению с ожидаемой (правда, только при высоких значениях величины рН реактива Шиффа, около 3) Уолкер и Ричардс [81] рассматривали как хороший пример влияния окружающих ДНК белков на интенсивность окрашивания клеток различного типа при использовании метода Фельгена.

На основании исследований относительных количеств ДНК в зрелых сперматозоидах человека, быка и морской свинки, окрашенных по методу галлоцианин-хромовые квасцы. Зандриттер, Кифер и Рик [20] пришли к выводу,



что снижение содержания красителя в зрелых сперматозоидах почти вдвое, по сравнению с ожидаемым, «...объясняется, вероятно, особенностями физико-химического состояния ДНК и связи между ДНК и белками в этих клетках, а также природой и количеством белка». При этом авторы отмечали хорошее совпадение полученных результатов с ожидаемыми при исследовании количеств ДНК в зрелых сперматозоидах цыплёнка (также петуха), лягушки и жабы, для которых отношение 1:2 между содержанием ДНК в зрелых сперматозоидах и диплоидных клетках (эритроцитах) сохраняется.

Особенно большое внимание снижению окрашиваемости ядер зрелых сперматозоидов у быка при использовании метода Фельгена, по сравнению с ядрами молодых сперматид, уделено в специальных исследованиях Гледхилла и его соавторов [66–70]. Эти исследования посвящены изучению количества ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов быка в связи с вопросом фертильности животных. В работе, в которой подведены общие итоги этих обширных исследований и в которой приведён достаточно полный список литературы, посвящённой затронутой проблеме, Гледхилл [69] приходит к заключению, что при нормальном биохимическом созревании дезоксирибонуклеопротеида (ДНП) в течение спермиогенеза у быка, которое характеризуется превращением гистона сперматид в более основные, аргинин богатые белки, и повышением силы электростатических связей ядерных белков с молекулой ДНК, имеет место снижение окрашивания по методу Фельгена, несмотря на тот факт, что количественных изменений ДНК по поглощению в ультрафиолете или изменению сухой массы нет. Ядра зрелых сперматозоидов при анализе в ультрафиолете, как у фертильных, так и у стерильных быков обычно содержат то же самое среднее количество ДНК и имеют ту же самую суммарную сухую

массу. Особенного внимания, на наш взгляд, и как это будет видно из дальнейшего изложения, заслуживает замечание Гледхилла [69], что снижение окрашиваемости по методу Фельгена, которое имеет место в течение спермиогенеза, значительно меньше выражено в сперматозоидах определённых быков с хорошо документированной, но необъяснимой стерильностью, чем в сперматозоидах нормальных фертильных быков. Гледхилл считает, что высокая окрашиваемость по методу Фельгена ядер зрелых сперматозоидов таких стерильных быков по сравнению с окрашиваемостью ядер зрелых сперматозоидов быков с нормальной фертильностью, вероятно, обусловлена ДНП-комплексом сперматозоидов. Если ДНК-белковый комплекс сперматозоидов каким-либо образом дефектен, то в результате этого продуцируются морфологически нормальные интенсивно окрашивающиеся, однако биохимически незрелые, сперматозоиды.

Взгляды, развиваемые в упомянутых работах, о большом влиянии белков, окружающих ДНК в ядерных структурах фиксированных клеток на результаты окрашивания по методу Фельгена нашли поддержку в ряде работ, посвящённых анализу кривых гидролиза ядер различных типов клеток [11, 19, 32, 42]. Так, Маршак, Бродский и Урываева [32] считают, что снижение количества ДНК в ядрах клеток некоторых типов (обнаруживаемое при цитофотометрии ядер, окрашенных по методу Фельгена) вызвано иным протеканием мягкого кислотного гидролиза в этих клетках по сравнению с другими, что связано с различиями в физическом состоянии ДНП-комплекса в различных клетках.

По мнению этих авторов, анализ кривых гидролиза поэтому представляет собой ещё один методический подход для оценки физического состояния генетического материала.

Заключая этот краткий литературный обзор, необходимо отметить, что общей характерной чертой работ (в том числе и не упомянутых здесь), посвящённых затронутой проблеме, является отсутствие сочетания цитофотометрических методов исследования с параллельными кариоморфологическими наблюдениями.

После целого ряда опытов, в которых преследовалась цель устранить снижение в два раза окрашиваемости ядер зрелых сперматозоидов млекопитающих на ДНК по сравнению с ожидаемой, и в которых не удалось этого добиться, – у нас возникло предположение, что это уменьшение связывания красителя вызвано не влиянием окружающих ДНК белков на протекание мягкого кислотного гидролиза и последующее окрашивание, а связано с действительным уменьшением содержания ДНК в гаплоидных ядрах в процессе спермиогенеза, то есть с элиминацией половины количества ДНК.

Это предположение было вскоре подкреплено наблюдением отброса половины количества ДНК из ядер сперматоцитов I порядка травяной лягушки в процессе образования сперматозоидов, что приводило к образованию только 2-х сперматозоидов, вместо ожидаемых 4-х, и отдельными наблюдениями (правда, очень редкими) случаев прямого отбрасывания целых глыбок ДНК в процессе образования зрелых сперматозоидов у морской свинки.

Стало очевидным, что мы имеем дело с явлением неизвестным до настоящего времени в клеточной биологии, но заслуживающим самого пристального изучения.

# I. ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ И ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментальной проверки нашего предположения о том, что уменьшение вдвое связывания красителя ядрами зрелых сперматозоидов млекопитающих (по сравнению с ожидаемым для гаплоидных клеток) не артефакт окрашивания ДНК по методу Фельгена, а результат действительного уменьшения содержания ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов, нами был использован целый ряд приёмов и методов цитохимического анализа.

Материалом в этих исследованиях служили семенники быка, морской свинки и петуха, а также, в отдельных опытах, травяной лягушки и сома. В ряде случаев материалом исследования служили также печень и кровь соответствующих животных.

Препараты семенников готовили методом отпечатков или (чаще) нанесением на предметные стекла взвеси клеток, получаемой осторожным разрыхлением семенников препаровальными иглами в соответствующем физиологическом растворе (использовали растворы Рингера для теплокровных и холоднокровных [41]). Опыт работы показал, что последний метод приготовления препаратов даёт возможность получать на препаратах больше механически неповреждённых ядерных структур клеток. Препараты печени готовили методом отпечатков.

Отпечатки семенников и печени, взвесь клеток семенников и крови на предметных стёклах, не допуская подсушивания клеток, фиксировали в смеси этанола и безводной уксусной кислоты (3:1) в течение 2-х часов при комнатной температуре или в течение 12-ти часов при 7–9°C, ополаскивали в 3-х сменах 96% этилового спирта и высушивали на воздухе. В ряде вариантов (для лучшего сохранения цитоплазмы клеток) применяли вначале

фиксацию в смеси этанола и ацетона 1:1 в течение 30 минут при комнатной температуре с последующей дофиксацией ДНП клеток в смеси этанола и уксусной кислоты 3:1 при комнатной температуре в течение 2-х часов, а также фиксацию клеток в парах OsO<sub>4</sub> (в течение 30 сек.) с последующей дофиксацией в смеси этанола и уксусной кислоты (2 часа). Для некоторых опытов клетки фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (2 часа) с последующей дофиксацией в 0,5%-ном растворе CrO<sub>3</sub> в 5%-ном водном растворе уксусной кислоты в течение 4-х часов при 1–4°C.

В процессе такой дофиксации происходит разобшение ДНК и гистонов в ДНП (в результате связывания ионов хрома фосфатными группами ДНК [51]) и частичное растворение гистонов в водном растворе уксусной кислоты [61]. После дофиксации препараты промывали в 6-ти сменах дистиллированной воды (по 5 мин. в каждой), 3-х сменах 2 % -ной серной кислоты (при 4°C) для удаления из клеток низших окислов хрома (по 10 мин. в каждой), в 6-ти сменах дистиллированной воды (по 5 мин. в каждой) и высушивали на воздухе [51].

Применённые фиксации способствуют хорошему сохранению локализации ДНП в ядерных структурах при кислотном гидролизе, а в случае окрашивания ДНК по люминесцентной модификации метода Фельгена не сказываются на интенсивности люминесценции (за исключением фиксации с применением паров OsO<sub>4</sub>) и дают возможность получать препараты, достаточно устойчивые к воздействию света, возбуждающего люминесценцию [51].

Препараты окрашивали по люминесцентной модификации метода Фельгена с применением реактива, приготовленного из риванола, в начальных опытах по прописи, предложенной ранее [50], а затем по прописи, разработанной позднее [58].

Сущность нового метода приготовления реактива из риванола заключается в осаждении основания 2-этоксип,9-диаминоакридина из риванола с последующим растворением полученного основания в растворе, содержащем сернистую кислоту. Этот метод отличается быстротой приготовления рабочего раствора красителя и даёт возможность получать хорошо воспроизводимые от опыта к опыту результаты окрашивания ядерных структур на ДНК.

Окрашивание по люминесцентной модификации метода Фельгена проводили следующим образом. Предметные стёкла с фиксированными клетками с применением наездников из отрезков полиэтиленовой трубки и капроновой лески увязывали в блок. Затем блок препаратов погружали в охлаждённый до 2–4°C 1N раствор HCl на 5 мин. Опыт работы показал, что такое предварительное пропитывание клеток на препаратах в охлаждённой 1N HCl является очень важной процедурой, благодаря которой все клетки и ядерные структуры независимо от их размера и плотности равномерно пропитываются 1N соляной кислотой в условиях, когда отщепления пуринов от ДНК практически не происходит. В результате такого предварительного пропитывания отщепление пуринов от ДНК в 1N HCl при 60°C начинается одновременно и во всём объёме фиксированных ядерных структур данного опыта и протекает одинаково не только в различных типах клеток данного животного, но и в клетках различных видов животных.

Об этом, в частности, свидетельствуют результаты цитофлуориметрического анализа ядер клеток быка, морской свинки, петуха, травяной лягушки и сома, окрашенных по люминесцентной модификации метода Фельгена в идентичных условиях: относительное содержание ДНК в ядрах одинаковой ploidyности (за

исключением ядер зрелых сперматозоидов млекопитающих) перечисленных объектов (табл. 1) достаточно хорошо соответствует относительному содержанию ДНК в ядрах млекопитающих, птиц, лягушек и костистых рыб, определённому биохимическим методом [16, 45].

Таблица 1

Результаты цитофлуориметрии ДНК в ядрах клеток на различных стадиях сперматогенеза и спермиогенеза (окрашивание препаратов клеток, представленных в таблице видов, по люминесцентной модификации метода Фельгена проведено одновременно, измерения проведены при одной и той же чувствительности цитофлуориметра).

Вид	Тип клеток (плоидность)	Число измерений	Интенсивность люминесценции в усл. ед. ( $\bar{x} \pm \delta$ )	К. В. (%)	Относительное содержание ДНК (для каждого вида)	Относительное содержание ДНК (между видами)
Бык	Просперматоциты (8n)	3	1020,0 $\pm$ 21,59	2,2	8,0	2,27(1n)
	Сперматоциты I пор. (4n)	50	511,8 $\pm$ 13,86	2,7	4,0	
	Сперматоциты II пор. (2n)	13	253,0 $\pm$ 11,4	4,5	1,98	
	Круглые сперматиды (1n)	42	127,8 $\pm$ 4,25	3,4	1,00	
	Продолговатые сперматиды (1n)	31	127,1 $\pm$ 5,74	4,5	0,99	
	Стадии элиминации (1n – 1c)	16	87,0 $\pm$ 17,4	20*	0,68	
	Зрелые сперматозоиды (1c)	38	64,2 $\pm$ 3,1	4,7	0,50	

Вид	Тип клеток (плоидность)	Число измерений	Интенсивность люминесценции в усл. ед. ( $\bar{x} \pm \delta$ )	К. В (%)	Относительное содержание ДНК (для каждого вида)	Относительное содержание ДНК (между видами)
Мор-ская свин-ка	Просперматоциты (8n)	5	1064,0 ± 21,9	2,0	8,00	2,37 (1n)
	Сперматоциты I пор. (4n)	35	529,4 ± 15,3	2,9	3,98	
	Сперматоциты II пор. (2n)	7	263,7 ± 4,96	1,8	1,98	
	Молодые сперматиды (1n)	30	133,1 ± 4,37	3,7	1,00	
	Зрелые сперматозоиды (1c)	25	67,2 ± 2,53	3,8	0,50	
Петух	Сперматоциты I пор. (4n)	19	282,6 ± 7,5	2,6	4,025	1,25 (1n, 1c)
	Ядра печени (2n)	14	142,5 ± 3,8	2,7	2,00	
	Сперматозоиды (1n, 1c)	24	70,2 ± 2,75	3,9	1,00	
Лягушка	Сперматоциты I пор. (4n)	6	1523,0 ± 5,5	0,4	4,02	6,76 (1n, 1c)
	Сперматозоиды (1n, 1c)	31	380,0 ± 7,6	2,0	1,00	
Сом	Сперматоциты I пор. (4n)	19	225,5 ± 3,3	1,1	4,01	1,00 (1n, 1c)
	Сперматозоиды (1n, 1c)	17	56,2 ± 2,1	3,7	1,00	
*) Высокий К.В. содержания ДНК в ядрах клеток на стадии созревания сперматозоидов у быка отражает степень элиминации ДНК в различных ядрах этой выборки.						



Гидролиз материала, фиксированного или дофиксированного в смеси этанола и уксусной кислоты проводили в 1N HCl при 60°C (в термостатируемых условиях) в течение 10 минут, а материала с дофиксацией в растворе хромового ангидрида в течение 13-ти минут.

По окончании проведения гидролиза препараты ополаскивали в сернистой воде (для охлаждения и удаления избытка HCl) и переносили в раствор 2-этокси-6,9-диаминодиакридина в сернистой воде.

Окрашивание в течение одного часа при 7–9°C при помешивании раствора красителя через каждые 10 минут. Затем препараты промывали в 4-х сменах сернистой воды при 7–9°C (по 3 мин. в каждой), в двух сменах 96° этанола (по 1–2 мин. в каждой), высушивали на воздухе и заключали под покровные стёкла (толщиной 0,15 мм) в нефлуоресцирующее вазелиновое масло или диметилфталат.

Наблюдения показали, что обычно применяемое после промывок в сернистой воде ополаскивание препаратов в дистиллированной воде приводит к тому, что значительная часть сперматозоидов большинства объектов (кроме сперматозоидов млекопитающих) при последующем высушивании лопаются. Этого не происходит, если вслед за промывками в сернистой воде следует проводка через спирты.

Чтобы условия обработки всех препаратов данного опыта были строго одинаковыми, растворы реактивов брали в достаточно больших объёмах (не менее 20 мл на одно предметное стекло).

Ядерные структуры, окрашенные по люминесцентной модификации метода Фельгена с применением реактива из 2-этокси-6,9-диаминоакридина, обладают яркой жёлто-зелёной люминесценцией, спектральная характеристика которой остаётся постоянной независимо от концентрации

ДНК, что связано с практически полным отсутствием метакромазии у 2-этокси-6,9-диаминоакридина.

Оптические свойства этого основного красителя также выгодно отличаются малой величиной реабсорбции люминесценции – кривые спектров поглощения и люминесценции перекрывают друг друга незначительно [52].

Измерение интенсивности люминесценции ядерных структур проводили с учётом рассмотренных нами ранее требований, предъявляемых к цитофлуориметру и измеряемым ядерным структурам [56]. При цитофлуориметрии использовали объектив апохромат 100× ап. 1,32 (фирмы Carl Zeiss).

В результате, во многих повторных опытах по измерению интенсивности люминесценции ядерных структур, окрашенных на ДНК по люминесцентной модификации метода Фельгена, с применением упомянутых выше способов фиксации, клеток семенников быка, морской свинки и петуха были получены данные, совпадающие с данными, полученными другими авторами [20, 68, 69]. Во всех этих опытах относительное содержание ДНК в ядрах сперматозоидов быка и морской свинки оказывалось вдвое меньшим, чем то, которое должно было быть в гаплоидных ядрах, а содержание ДНК в ядрах сперматозоидов петуха соответствовало ожидаемому для гаплоидных клеток (табл. 1). Эти отношения в содержании ДНК сохранялись и при самом широком варьировании режима проведения мягкого кислотного гидролиза: в 1N HCl при 60°C от 7-ми<sup>\*</sup> до 15-ти минут для материала, фиксированного в смеси этанола и уксусной кислоты, и от 10-ти до 25-ти минут для материала с последующей дофиксацией в растворе CrO<sub>3</sub>, а также 24-х часовой гидролиз материала, фиксированного по второму способу, в 5%-ной хлорной кислоте при 1–2°C.

\*) Время проведения кислотного гидролиза в 1N HCl при 60°C. меньше 7-ми минут мы не использовали, так как ранее было обнаружено, что при кратковременном кислотном гидролизе РНК удаляется из клеток и ядер неполностью, но приобретает способность окрашиваться в реактиве Шиффа из риванола [53].

Эти наблюдения давали основания считать, что уменьшение окрашиваемости ядер зрелых сперматозоидов быка и морской свинки не является, по крайней мере, артефактом, вызванным влиянием тех или иных ядерных белков на процесс отщепления пуринов от ДНК при кислотном гидролизе, так как такое влияние должно было бы проявить себя различно при столь различающихся режимах проведения гидролиза (см. также ниже опыты по дезаминированию белков).

Прежде чем перейти к описанию наших дальнейших опытов по выявлению ДНК в ядерных структурах, необходимо остановиться на результатах цитофотометрии ядерных форм на разных стадиях спермиогенеза у быка при окрашивании на основные белки.

По данным Гледхилла с соавторами [67, 69, 70] окрашиваемость ядер зрелых сперматозоидов быка на основные белки более чем в два раза выше при использовании реакции Сакагуши и более чем в 13 раз выше при использовании щелочного окрашивания бромфеноловым синим по сравнению с окрашиваемостью ядер круглых сперматид.

Наши опыты по щелочному окрашиванию ядерных структур клеток на различных стадиях спермиогенеза у быка и морской свинки с применением в качестве кислотного красителя примулина по методике, разработанной ранее [46], с последующим цитофлуориметрическим анализом окрашенных ядерных структур привели к совершенно иным результатам.

Опыты показали, что, если при цитофлуориметрическом анализе строго отбирать только те ядерные формы, у которых хорошо сохранены ядерные мембраны и характерная для каждой стадии морфология ядра, то никаких различий в окрашиваемости на основные белки ядер клеток на различных стадиях спермиогенеза у быка и морской свинки обнаружить не удаётся. Ядра молодых (круглых) сперматид, продолговатых сперматид и зрелых сперматозоидов у быка (см. фото 2–5, стр. 32) и ядра молодых сперматид и зрелых сперматозоидов у морской свинки обнаруживают одинаковую интенсивность люминесценции (табл. 2).

Несколько забегаая вперёд, здесь следует отметить то, что в упомянутых выше работах [67, 69, 70] авторы ошибочно принимали гаплоидные ядра особой популяции клеток, всегда присутствующей в семенниках животных, за ядра молодых сперматид, о чём свидетельствуют приводимые авторами микрофотографии. Более подробно этот вопрос будет рассмотрен в следующем разделе нашей монографии, посвящённом морфологическим и цитофлуориметрическим исследованиям (см. стр. 34).

Различия в окрашиваемости ядер на основные белки в клетках на разных стадиях спермиогенеза у быка, полученные Гледхиллом с соавторами [67], по нашему мнению, могли быть вызваны следующими причинами.

Если выявление ДНК по методу Фельгена требует только проведения перед окрашиванием мягкого кислотного гидролиза, в результате которого от ДНК отщепляются пуриновые основания, но нуклеогистон в ядерных структурах фиксированных клеток в целом сохраняется, то щелочное окрашивание основных белков требует полного предварительного удаления одного из компонентов ДНП, а именно ДНК, с помощью более жёсткого кислотного гидролиза.

Таблица 2

Результаты цитофлуориметрии ядер на различных стадиях спермиогенеза у быка и морской свинки, окрашенных примулином на основные белки ( $pH = 8,2 \pm 1$ )

Вид	Тип клеток	Число измерений	Интенсивность люминесценции в усл. ед. ( $\bar{x} \pm \delta$ )	К. В. (%)	Относительное содержание примулина (для каждого вида)
Бык	Сперматоциты I пор. (4n)	7	314,74 $\pm$ 4,7	1,1	4,07
	Круглые сперматиды (In)	15	77,5 $\pm$ 4,7	6,1	1,00
	Продолговатые сперматиды(In)	15	77,5 $\pm$ 3,7	5,0	1,00
	Зрелые сперматозоиды(In,Ic)	15	77,3 $\pm$ 4,1	5,4	1,00
Морская свинка	Молодые сперматозоиды (In)	15	95,0 $\pm$ 5,3	5,4	1,00
	Зрелые сперматозоиды (In, Ic)	15	95,8 $\pm$ 4,9	5,1	1,01

В результате в ядерных структурах остаются только белковые компоненты ДНП, не сцементированные сахарофосфатным скелетом молекул ДНК.

Ясно, что при этом незначительные повреждения оболочек ядер и внутриядерных структур в результате механических повреждений и процессов автолиза перед фиксацией клеток могут приводить к очень значительным потерям основных белков в процессе удаления из них ДНК и при проведении последующего щелочного окрашивания

(при величине рН = 8,2), Наблюдения показывают, что, если при цитофлуориметрии ДНК на препаратах к интактным ядерным структурам может быть отнесено примерно 10% делящихся или интерфазных ядер, то при цитофлуориметрическом анализе основных белков, окрашенных примулином (рН = 8,2 ± 0,1) количество ядер, которые можно отнести к интактным на тех же препаратах, становится чрезвычайно малым (около 1%).

Ядра упомянутых выше гаплоидных клеток, которые имеются и в семенниках быка, ошибочно принимаемые авторами [67] за ядра круглых сперматид, особенно легко повреждаются при приготовлении препаратов. В повреждённых ядрах таких клеток при щелочном окрашивании примулином окрашиваются на основные белки только крупные каплевидные хромоцентры ядер (фото 6, стр. 32), которые при цитофлуориметрии дают сигнал, примерно в 10–15 раз меньше по сравнению с сигналом от интактных ядер круглых сперматид быка (фото 2, стр. 32).

О том, что упомянутые авторы измеряли поглощение именно таких повреждённых ядерных форм, свидетельствует низкая величина поглощения и очень большой разброс между величинами поглощения ядер внутри отдельных выборок.

Показательно также то, что при окрашивании основных белков с помощью проведения реакции Сакагуши, которая не требует предварительного удаления ДНК из ДНП, авторы [67] получили гораздо меньшее различие (всего в 2 раза) в окрашиваемости основных ядерных белков в ядрах «круглых сперматид» и зрелых сперматозоидов (однако, возможно, что и в этом случае большое количество основных белков из ядер гаплоидных клеток терялось в результате заключения окрашенных препаратов в раствор гипохлорита калия, имеющего ярко выраженные щелочные свойства).

Таким образом, основная посылка упомянутых авторов [66–70] о том, что по мере образования сперматозоидов в их ядрах образуется и накапливается большое количество белков с резко выраженными основными свойствами, что и определяет снижение окрашиваемости ядер зрелых сперматозоидов у быка, при выявлении ДНК по методу Фельгена, – основана на ошибочных результатах оценки суммарного положительного заряда основных белков в ядрах клеток на разных стадиях спермиогенеза у быка.

Однако известно, что дезоксирибонуклеопротеид в ядрах сперматозоидов некоторых видов животных находится в состоянии, близком к кристаллическому [82]. Поэтому вероятное наличие такой плотной упаковки ДНП и в ядрах зрелых сперматозоидов млекопитающих не исключало возможности того, что часть первичных аминокрупп белков, входящих в ДНП этих ядер, вступает после проведения мягкого кислотного гидролиза в реакцию с альдегидными группами апуриновой ДНК и, образуя азометиновые основания, препятствует связыванию красителя. На такое же предположение наталкивали, в частности, результаты следующего опыта.

После проведения мягкого кислотного гидролиза фиксированных клеток из семенников быка одну часть препаратов окрашивали в реактиве из парарозанилина (подкисленного HCl или SOCl<sub>2</sub>), а другую часть препаратов – в реактиве из 2-этокси-6,9-диаминоакридина (подкисленного HCl или SOCl<sub>2</sub>). После проведения окрашивания (в течение 30 мин. при комнатной температуре) в этих реактивах препараты промывали в соответствующих растворах (0,02N HCl или сернистой воде) и перекладывали для переокраски в другой реактив (окрашенные в реактивах из парарозанилина в реактивы из 2-этокси-6,9-диаминоакридина и наоборот) на 30 мин. при комнатной температуре. При этом было выяснено, что

переоцветки ядер клеток в реактиве, приготовленном из другого красителя, во всех восьми вариантах опыта не происходит (наблюдались лишь очень лёгкая подцветка).

С одной стороны, эти результаты лишней раз свидетельствовали о том, что реактивы, приготовленные из основных красителей (молекулы которых содержат первичные аминогруппы), независимо от того содержат ли они в своём составе сернистую кислоту или нет, реагируют с апуриновой ДНК одинаково [58]. С другой стороны, что важно в данном случае, из этого опыта следовало, что образующийся вначале окрашенный комплекс красителя с апуриновой ДНК является достаточно прочным и не разрушается при выдерживании в подкисленном растворе другого красителя. Поэтому, если после проведения мягкого кислотного гидролиза имеет место образование подобных комплексов апуриновой ДНК с основными белками в ядрах зрелых сперматозоидов млекопитающих, это должно препятствовать окрашиванию таких ядер по методу Фельгена.

Для того чтобы проверить существует ли такой источник артефакта окрашивания ядер зрелых сперматозоидов млекопитающих по методу Фельгена, мы применили дезаминирование препаратов клеток из семенников быка, морской свинки и петуха по методу Лилли [27]. Для этого препараты клеток, фиксированных в смеси этанола и уксусной кислоты (см. выше), обрабатывали 1N раствором нитрита натрия ( $\text{NaNO}_2$  хч) в 1 N растворе уксусной кислоты при 20–22°C (величина рН раствора равна 2,2), который сменяли каждые 24 часа. Протекание дезаминирования контролировали каждые 12 или 24 часа с помощью щелочного окрашивания на основные белки (при рН = 8,2 ± 0,1) с применением в качестве кислотного красителя примулина.

Наблюдения показали, что ядерные структуры клеток на всех стадиях сперматогенеза и спермиогенеза (за



исключением зрелых сперматозоидов) перестают окрашиваться на основные белки у быка и морской свинки через 24 часа, у петуха через 12 часов. Ядра сперматозоидов петуха перестают окрашиваться на основные белки после 24-х часового дезаминирования, а окраска ядер зрелых сперматозоидов быка и морской свинки на основные белки после 48-ми часового дезаминирования ослабевала, примерно в 10 раз по сравнению с контролем. При более продолжительном дезаминировании ядерные структуры клеток на всех стадиях сперматогенеза и спермиогенеза у быка и морской свинки начинают разрушаться.

По окончании дезаминирования препараты промывали в 6-ти сменах сернистой воды (по 3 мин. в каждой) и без дополнительного кислотного гидролиза в 1N HCl (в процессе дезаминирования происходит удаление РНК и отщепление пуринов от ДНК) окрашивали по люминесцентной модификации метода Фельгена, как это описано выше.

Цитофлуориметрический анализ препаратов, окрашенных на ДНК по люминесцентной модификации метода Фельгена после дезаминирования, дал результаты, полностью совпадающие с теми, которые были получены нами с применением различных способов фиксации без проведения дезаминирования. И в этом случае относительное содержание ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов быка и морской свинки оказалось вдвое меньшим по сравнению с ожидаемым для гаплоидных клеток, а у петуха соответствовало ожидаемому (табл. 3).

Таким образом, дезаминирование белков, входящих в состав ДНП ядерных структур фиксированных клеток перед проведением окрашивания ДНК по люминесцентной модификации метода Фельгена, не повлияло на степень связывания красителя ядрами сперматозоидов.

Тем не менее, для устранения сомнений относительно того, что снижение окрашиваемости ядер зрелых сперматозоидов млекопитающих по сравнению с ожидаемым для гаплоидных клеток – не артефакт цитохимического выявления и цитофлуориметрического метода анализа ДНК, а отражение действительного снижения содержания ДНК в гаплоидных ядрах в процессе спермиогенеза, необходимо было сравнить полученные результаты с результатами выявления ДНК с помощью достаточно независимого количественного цитохимического метода, при использовании которого влияние белков на результаты выявления ДНК было бы заведомо исключено.

Таким независимым методом, как нам кажется, является разработанный нами специально для проведения настоящего исследования **цитохимический метод выявления ДНК в ядрах фиксированных клеток животных**, сущность которого заключается в проведении реакции восстановления металлического серебра альдегидами 2-дезоксирибозы апуриновой ДНК из раствора аммиаката серебра, приготовленного с учётом требований химизма реакции [57].

Таблица 3

Результаты цитофлуориметрии ДНК в ядрах клеток на различных стадиях сперматогенеза после проведения дезаминирования

Вид	Тип клеток (плоидность)	Число измерений	Интенсивность люминесценции в усл.ед. ( $\bar{x} \pm \delta$ )	К.В. (%)	Относительное содержание ДНК (для каждого вида)
Бык	Сперматоциты I пор. (4n)	15	135,0 ± 3,8	2,8	3,97
	Круглые сперматиды (1n)	30	34,0 ± 1,28	3,8	1,00
	Стадии созревания (1n – 1c)	38	27,5 ± 4,3	15,6*	0,80
	Зрелые сперматозоиды (1c)	37	17,3 ± 1,43	8,2**	0,50
Морская свинка	Сперматоциты I пор. (4n)	16	529,2 ± 12,9	2,5	4,00
	Сперматоциты II пор. (2n)	22	264,0 ± 4,1	1,5	1,99
	Молодые сперматиды (1n)	23	132,5 ± 1,1	0,93	1,00
	Зрелые сперматозоиды (1c)	37	66,3 ± 1,2	1,9	0,50
Петух	Сперматоциты I пор. (4n)	24	183,3 ± 5,2	2,9	4,06
	Сперматозоиды (1n, 1c)	23	45,1 ± 2,15	4,6	1,00
<p>*) Высокий К.В. содержания ДНК в ядрах клеток на стадии созревания сперматозоидов у быка отражает степень элиминации ДНК в различных ядрах этой выборки.  **) Сравнительно высокий К.В. содержания ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов у быка, по-видимому, результат того, что при измерениях в выборку попали ядра на стадии созревания</p>					

Реакцию и последующий цитофотометрический анализ относительных количеств восстановленного серебра в ядрах фиксированных клеток проводили следующим образом.

Препараты с отпечатками или мазками взвеси клеток, фиксированных в смеси этанола и уксусной кислоты, подвергали мягкому кислотному гидролизу в 1N HCl при 60°C, как это описано выше, промывали в 10-ти сменах дистиллированной воды при 20°C (по 30 сек. в каждой), высушивали на воздухе и переносили в раствор аммиаката серебра (величина pH раствора равна  $8,0 \pm 0,05$ ).

Обработку препаратов в растворе аммиаката серебра проводили в течение 48-ми часов при температуре 25–27°C. Затем препараты промывали при комнатной температуре в 4-х сменах 2%-го водного раствора уксусной кислоты (по 1 мин. в каждой) для растворения осадка закиси серебра, осевшей на препаратах, ополаскивали дистиллированной водой, высушивали на воздухе и заключали под покровные стекла в нефлуоресцирующее иммерсионное масло или диметилфталат.

Относительные количества восстановленного серебра в ядерных структурах клеток определяли с помощью цитофотометрического анализа препаратов в падающем плоско-поляризованном свете [57].

Как видно из данных, приведённых в таблице 4, измерения относительных количеств серебра, восстановленного в ядрах клеток, находящихся на различных стадиях сперматогенеза и спермиогенеза быка (фото 7–10, стр. 33), морской свинки и петуха (фото 11 – 12, стр. 33), дали результаты идентичные тем, которые были получены при цитофлуориметрическом анализе ДНК в таких ядрах (таблицы 1 и 3).

Таблица 4

Результаты цитофотометрии в отражённом свете относительных количеств восстановленного серебра в ядрах клеток на различных стадиях сперматогенеза и спермиогенеза

Вид	Тип клеток (плоидность)	Число измерений	Относительные количества восстановленного серебра в усл.ед. ( $\bar{x} \pm \delta$ )	К.В (%)	Относительное содержание серебра (для каждого вида)
Бык	Сперматоциты I пор. (4n)	16	300,9 ± 12,4	4,1	3,95
	Круглые сперматиды (1n)	16	76,1 ± 1,9	2,5	1,00
	Продолговатые сперматиды (1n)	11	76,0 ± 2,7	3,5	1,00
	Зрелые сперматозоиды (1c)	25	38,4 ± 1,9	5,1	0,50
Морская свинка	Сперматоциты I пор. (4n)	20	317,4 ± 9,5	3,0	3,96
	Молодые сперматиды (1n)	19	80,2 ± 3,7	4,6	1,00
	Зрелые сперматозоиды (1c)	28	40,2 ± 1,33	3,3	0,50
Петух	Сперматоциты I пор. (4n)	16	148,4 ± 5,6	3,7	4,01
	Сперматозоиды (1n, 1c)	19	37,0 ± 1,1	3,1	1,00

Совпадение результатов цитофотометрического анализа относительных количеств восстановленного серебра в ядрах клеток с результатами цитофлуориметрического анализа ДНК в ядрах клеток, с одной стороны, свидетельствуют о том, что цитохимический метод выявления ДНК, основанный на восстановлении серебра из раствора аммиаката серебра альдегидными группами апуриновой ДНК, является количественным цитохимическим методом. С другой стороны, то обстоятельство, что количество восстановленного серебра в ядрах зрелых сперматозоидов быка и морской свинки также оказалось вдвое меньше ожидаемого количества для гаплоидных ядер, свидетельствует о том, что этот метод – или также непригоден для количественного анализа ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов млекопитающих как и метод Фельгена, – или же, напротив, подтверждает объективность метода Фельгена.

То, что справедливым является последнее, следует из результатов опыта, описанного в работе, посвящённой изучению химизма нуклеального окрашивания по методу Фельгена [58].

В этой работе, в частности, было показано, что, если сначала провести окрашивание ядер фиксированных клеток по методу Фельгена, и полученные окрашенные на ДНК (парарозанилином или 2-этокси-6,9-диаминоакридином) препараты клеток перенести в раствор аммиаката серебра, то количество восстановленного серебра в предварительно окрашенных по методу Фельгена ядрах равно количеству восстановленного серебра в ядрах контрольных неокрашенных на ДНК клеток, подвергнутых мягкому кислотному гидролизу.

В данном случае важно то, что из результатов этого опыта следует, что образующиеся при реакции апуриновой ДНК с основными красителями окрашенные соединения (азометиновые основания) не препятствуют реакции вос-

становления серебра альдегидами апуриновой ДНК из раствора аммиака серебра. Следовательно, даже в том случае, если имеет место образование соединений апуриновой ДНК и основных белков, входящих в состав ДНП после проведения мягкого кислотного гидролиза, то это не может повлиять на количество восстановленного серебра в ядрах клеток.

В то же время совпадение результатов окрашивания по методу Фельгена с результатами проведения реакции восстановления серебра указывает на то, что соединений апуриновой ДНК с основными белками не образуется.

Таким образом, всё вышеизложенное подтверждает наше предположение о том, что уменьшение в 2 раза связывания основных красителей ядрами зрелых сперматозоидов млекопитающих по сравнению с ожидаемым для гаплоидных ядер не артефакт цитохимического выявления ДНК по методу Фельгена и последующего цитофлуориметрического анализа ДНК, а результат элиминации половины количества ДНК из ядер молодых сперматид по мере их превращения в зрелые сперматозоиды.

Тут следует заметить, что в процессе превращения ядер сперматид в ядра зрелых сперматозоидов происходит, по-видимому, только элиминация половины количества содержащейся в них ДНК, но не гистона (у животных, относящихся к другим классам, как это будет ясно из дальнейшего изложения, элиминируется при спермиогенезе половина нуклеогистона).

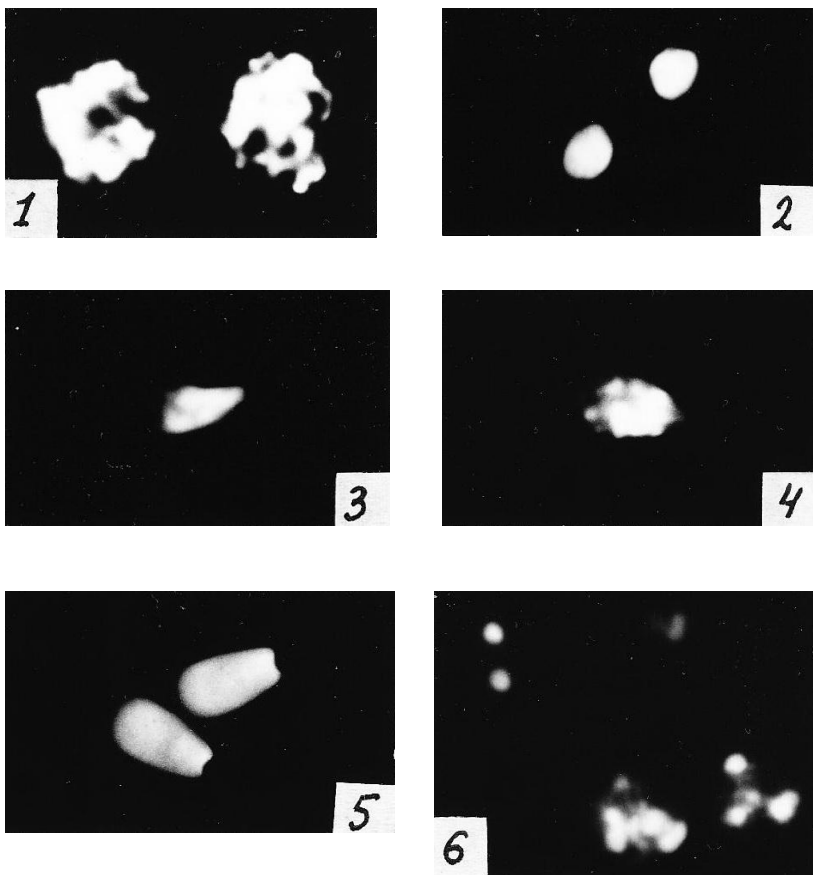
Действительно, как было показано выше (таблица 2), суммарный положительный заряд основных белков в ядрах зрелых сперматозоидов млекопитающих не отличается от суммарного заряда основных белков в ядрах молодых сперматид и вчетверо меньше, чем в ядрах сперматоцитов

I порядка, в то время как относительное содержание ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов вдвое меньше, чем в ядрах молодых сперматид (таблица 1).

Отсюда, по-видимому, можно сделать вывод, с одной стороны, о том, что в процессе спермиогенеза у млекопитающих не происходит замены гистонов на более основные белки (протамины), как это происходит у птиц, рыб и моллюсков [4] (биохимических данных, свидетельствующих о подобных превращениях основных белков в сперматозоидах млекопитающих, нет). С другой стороны, из отмеченного выше также следует и то, что в ядрах зрелых сперматозоидов млекопитающих ДНК связана с вдвое большим количеством основных белков, по сравнению с количеством основных белков в ядрах молодых сперматид. Этим, возможно, и объясняется высокая устойчивость таких ядер к внешним воздействиям (например, при хранении спермы, приготовлении препаратов и т. п.).

Для выяснения вопроса о том, как происходит и насколько универсально обнаруженное нами явление элиминации половины ДНК, содержащейся в сперматозитах I порядка, в процессе спермиогенеза – мы провели детальное морфологическое исследование смены ядерных форм в процессе образования мужских половых клеток не только у рассмотренных выше объектов, но и у целого ряда других видов животных, относящихся к разным классам. Описанию результатов этих исследований посвящена следующая часть настоящей монографии.

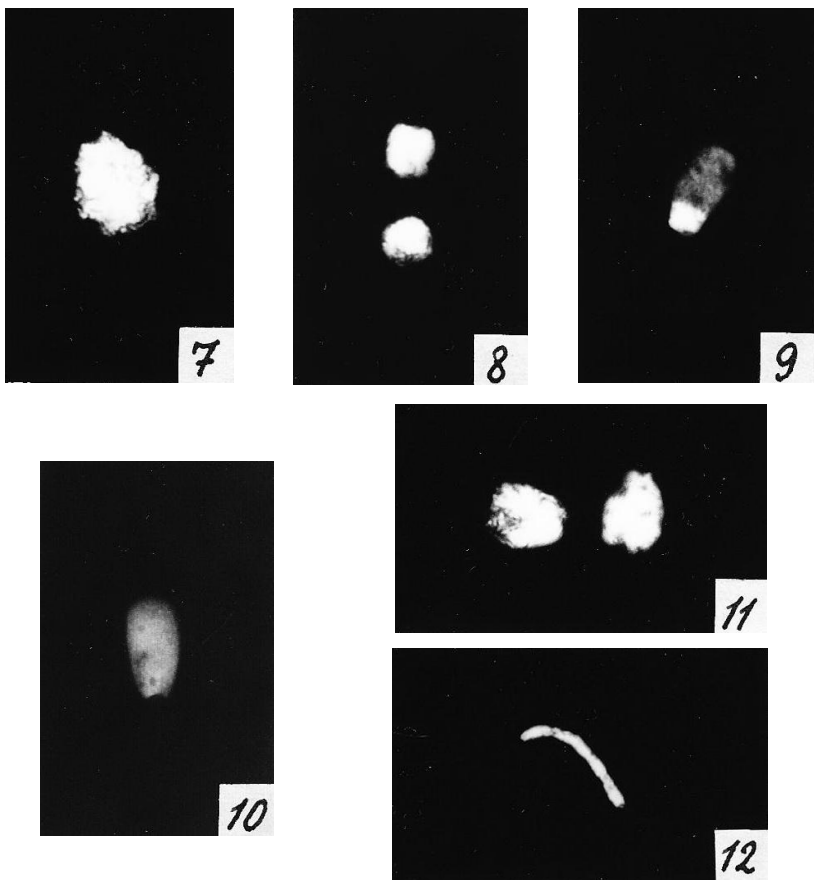




**Фото 1-6**

**Окраска на основные белки примулином**

Люминисцентный микроскоп об. 100×, ап. 1,32: ОК. 3× (гомаль). **1** – делящиеся ядра сперматоцитов I пор.; **2** – ядра круглых сперматид; **3, 4** – ядра продолговатых сперматид; **5** – ядра зрелых сперматозоидов; **6** – ядра лизирующих клеток быка



**Фото 7-12**

**Результат реакции восстановления серебра из  
растворов аммиаката серебра альдегидами апуриновой  
ДНК**

Отражённый поляризованный свет, об. 100×, ап. 1,32;  
ОК. 3× (гомаль). **7** – ядро сперматоцита I пор.; **8** – ядра  
круглых сперматид; **9** – ядро продолговатой сперматиды в  
заключительной стадии; **10** – ядро зрелого сперматозоида  
быка; **11** – ядро сперматоцитов I пор. петуха; **12** – ядро  
зрелого сперматозоида петуха

## 2. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служили семенники 16-ти видов животных, относящихся к 7-ми классам, 3-м типам животного царства, а именно: быка (*Bos taurus*), морской свинки (*Cavia cobaya*), мыши (*Mus musculus*), человека (*Homo sapiens*), петуха (*Gallus domesticus*), голубя (*Columba livia*), ужа (*Natrix natrix*), степной черепахи (*Testudo horsfieldi*), травяной лягушки (*Rana temporaria*), озёрной лягушки (*Rana ridibunda*), жабы зелёной (*Bufo viridis*), вьюна (*Misgurnus fossilis*), сома (*Silurus glanis*), моллюска беззубки (*Anodonta mutabilis*), представителя саранчовых бурого конька (*Chorthippus apricarius*) и стрекозы желтоватой (*Sumpetrum flaveolum*)\*. В ряде случаев материалом исследования служили также печень и кровь соответствующих видов животных.

\*) Эти два вида насекомых были для нас любезно определены П. Н. Дубровиным, сотрудником кафедры энтомологии МГУ.

Приготовление препаратов клеток, фиксацию клеток (которую проводили не позднее, чем через 4 часа после взятия материала в случае быка и человека; и через 20 мин. – в случае других видов животных) и окрашивание на ДНК по люминесцентной модификации метода Фельгена с применением реактива, приготовляемого из риванола, проводили как это описано выше.

Для выяснения некоторых частных вопросов, кроме того, использовали микротомные срезы семенников мыши и лягушки (*R. ridibunda*). Заливку материала (фиксированного в смеси этанола и уксусной кислоты) в парафин и приготовление срезов проводили по методу М. С. Навашина [35]. Окрашивание срезов семенников на

ДНК также проводили по люминесцентной модификации метода Фельгена.

Необходимо отметить, что, как правило, во время приготовления препаратов клеток из семенников каждого данного животного проводилось наблюдение живых клеток (в соответствующем физиологическом растворе) под микроскопом в положительном фазовом контрасте (об. 40× ап. 0,65; ок. 10×). Такие наблюдения давали предварительное представление о размерах, форме и подвижности различных типов клеток, встречающихся в семенниках животных и способствовали в дальнейшем их идентификации на препаратах фиксированных клеток, окрашенных на ДНК по люминесцентной модификации метода Фельгена.

При микрофотографировании ядерных форм в свете люминесценции (которое всегда проводили после предварительного цитофлуориметрического измерения относительного содержания в них ДНК) использовали микрофотонасадку МФН-10 (ЛОМО), которую устанавливали на цитофлуориметр вместо цитофлуориметрической насадки. При визуальных наблюдениях, цитофлуориметрии и микрофотографировании использовали объектив апохромат 100× ап. 1,32 (фирмы Carl Zeiss). При фотографировании применяли окуляр гомаль 3× (ЛОМО). Фотографирование проводили на отечественной киноплёнке МЗ-2 (90 ед. ГОСТа), изопанхром, которая выгодно отличается от других доступных фотоплёнок сравнительно низкой зернистостью при довольно высокой светочувствительности и наличием эффективного противореального слоя.

При условиях возбуждения люминесценции, описанных ранее [56], при фотографировании использовали выдержку равную 75 сек. Проявляли плёнку в метоловом мелкозернистом выравнивающем двухрастворном проявителе [33]. Время проявления 7+4 мин.

(при 20°C). Выбор этого проявителя был продиктован необходимостью получения возможно более мелкого зерна на негативах и уменьшения влияния ореолов.

Следует заметить, что на микрофотографиях таких самосветящихся структур, которыми являются ядерные структуры, окрашенные на ДНК по люминесцентной модификации метода Фельгена невозможно передать относительную интенсивность их люминесценции (особенно в тех случаях, когда они различны по размерам), так как сами микрофотографии не являются самосветящимися объектами.

Далеко не полно может быть передана на микрофотографиях и характерная для каждой ядерной структуры тонкая морфология распределения в ней ДНК, как из-за зернистости получаемых негативов, так и потому, что на микрофотографиях регистрируется только какая-то одна плоскость объекта, на которую сфокусирован микроскоп, в то время как при визуальных наблюдениях благодаря непрерывной работе микровинтом микроскопа можно наблюдать объект во всём его объёме.

В равной мере эти замечания относятся к ядерным структурам, с восстановленным в них металлическим серебром при фотографировании и наблюдении в отражённом поляризованном свете.

Кроме того, наши наблюдения показали, что скорость выцветания люминесценции ядерных структур во время фотографирования различна даже для структур, расположенных в одной цитоплазме, что объясняется различной степенью сохранности этих структур к моменту фиксации клетки. Поэтому общее количество света, попадающего на фотоплёнку, будет различным от различных микроструктур – независимо от того, используются длительные экспозиции при сравнительно низкой интенсивности света, возбуждающего люминесценцию (как в нашем случае), или короткие

экспозиции при больших интенсивностях возбуждающего света (при применении импульсной техники).

Соответственно и степень почернения фотоплёнки будет различной даже для структур, связавших одинаковое количество флуорохрома. Учитывая это, по-видимому, не следует применять фотографический метод для оценки относительной интенсивности люминесценции в биологических объектах, как это рекомендуют некоторые авторы [2]\*.

\*) В случае цитофлуориметрического анализа – измерения обычно производятся в первые 10–15 сек. с момента начала облучения микроструктур возбуждающим люминесценцию светом (при сравнительно низкой его интенсивности), то есть тогда, когда выцветание ещё не началось.

Из-за различий в степени почернения негативов при фотографировании изучаемых ядерных форм – в настоящем исследовании приходилось значительно варьировать временем экспозиции в процессе фотопечати и использовать фотобумагу различной контрастности с тем, чтобы передать на микрофотографиях, хотя бы приближённо, относительную яркость люминесценции ядерных форм.

Конечное увеличение (при фотопечати) ядерных форм на всех микрофотографиях, приведённых в настоящей минографии 1400×, увеличение на негативах 370×.

Для удобства восприятия иллюстративного материала мы применили единую систему обозначения микрофотографий для всех 16-ти изученных видов животных, которая приведена в таблице 5.

Отличительной особенностью методического подхода, применённого в настоящем исследовании, по сравнению с аналогичными исследованиями сперматогенеза и спермиогенеза у животных, проведёнными другими авторами, является сочетание морфологического изучения смены ядерных форм в клетках на различных стадиях сперматогенеза и спермиогенеза в поле зрения люминесцентного микроскопа с одновременным цито-флуориметрическим анализом относительного содержания ДНК в изучаемых ядерных структурах.

Ясно, что такой методический подход возможен в настоящее время только при использовании цитофлуориметрического анализа ДНК, так как только цитофлуориметрия позволяет за считанные секунды получить информацию об относительном содержании ДНК в той или иной клетке, что даёт возможность сразу сопоставить несколько ядерных структур нескольких клеток, расположенных в поле зрения микроскопа – как по морфологии, так и по относительному содержанию в них ДНК.

Важно и то, что, как показала практика нашей работы, информативность люминесцентных картин при микроскопировании для глаза наблюдателя намного выше, чем информативность картин, наблюдаемых в проходящем свете микроскопа при использовании абсорбционных методов цитологического анализа.

Ядерные структуры при микроскопировании в свете люминесценции выглядят объёмными, а более высокая чувствительность люминесцентного метода по сравнению с абсорбционным позволяет строже и объективнее оценивать ядерные структуры в отношении их морфологии и интактности.

Таблица 5

## Обозначения на микрофотографиях

Ядерные формы различных типов клеток (плоидность, $n$ ; содержание ДНК в ед. $c$ )	Обозначения на фото
Делящиеся ядра сперматогоний ( $4n-8n-4n$ )	1
Ядра последней генерации сперматогоний в S периоде, по завершении которого сперматогонии превращаются в просперматоциты I ( $4n-x4n$ )	2S
Ядра просперматоцитов I ( $x4n$ )	2
Стадии деления ядер просперматоцитов I, в результате которого образуются ядра сперматоцитов 1-го порядка ( $x4n-4n$ )	2a, 2b, 2c . . .
Вновь образовавшиеся ядра сперматоцитов I-го порядка в общей цитоплазме или в отдельных клетках ( $4n$ )	3
Стадии 1-го деления мейоза ( $4n-2n+2n$ )	3a, 3b, 3c . . .
Результат 1-го деления мейоза: 1) вновь образовавшиеся ядра сперматоцитов II-го порядка в общей цитоплазме или в отдельных клетках, $2n$ ; 2) группа, состоящая из 2-х формирующихся ядер сперматозоидов и 2-х или многих элиминируемых тел ( $2n+2n$ )	4
Стадии 2-го деления мейоза ( $2n$ )	4a, 4b, 4c . . .
Результат 2-го деления мейоза: 1) ядра двух молодых сперматид у млекопитающих ( $1n, 2c$ ) и насекомых ( $1n, 1c$ ); 2) группа, состоящая из 1-го формирующегося ядра сперматозоида и 1-го или многих элиминируемых тел (у животных друг. классов ( $1n, 1c+1n, 1c$ ))	5
Стадии увеличения размеров ядер сперматид и перераспределение ДНП в ядрах до начала элиминации ДНК, у млекопитающих ( $1n, 2c$ )	5a, 5b, 5c



Продолжение табл. 5

Ядерные формы различных типов клеток (плоидность, $n$ ; содержание ДНК в ед. с)	Обозначения на фото
Стадии элиминации ДНК из ядер сперматид у млекопитающих (2с–1с) и из клеток после 1-го или 2-го делений мейоза у животных других классов (с одновременным формированием в клетках ядер зрелых сперматозоидов)	6а, 6б, 6с . . или 6
Ядра зрелых сперматозоидов (1n, 1с)	7
Стадии формирования ядер сперматозоидов у представителя насекомых (бурого конька (1n, с)	7а, 7б, 7с . .
Элиминируемые тела	8
Ядра лизирующих клеток: (1n, 2с – у млекопитающих; 1n, 1с – у животных других классов) 1) в S периоде, 1n – 2n 2) делящиеся 3) интерфазные	9S 9а, 9б, 9с . . 9
Ядра клеток эпителия семенных канальцев (клеток Сертоли): (2n, 4с – у млекопитающих; 2n, 2с – у животных других классов) 1) в S периоде, 2n – 4n 2) делящиеся 3) интерфазные	10S 10а, 10б, 10с 10
Ядра интерстициальных клеток (клеток Лейдига): (2n, 4с – у млекопитающих; 2n, 2с – у животных других классов) 1) в S периоде, 2n – 4n 2) делящиеся 3) интерфазные	11S 11а, 11б, 11с 11
Ядра эритроцитов (2n, 2с)	12

**Примечание.** Если по данному виду имеется несколько микрофотографий, на которых представлены ядерные формы на одинаковых стадиях, то рядом с основными обозначениями проставлены дополнительные цифры, например: 9<sub>(1)</sub>, 9<sub>(2)</sub> и т.д. или: 9а<sub>1</sub>, 9а<sub>2</sub> и т.д.

Другой особенностью методического подхода, применённого в настоящем исследовании, является то, что изучение сперматогенеза и спермиогенеза проводилось практически одновременно на целом ряде видов животных, относящихся к разным классам, и не менее чем на двух видах, относящихся к одному классу (исключение составляет класс моллюсков, в котором изучался только один представитель – беззубка).

Это позволило при наблюдениях отдифференцировать те или иные патологические отклонения от нормального протекания сперматогенеза и спермиогенеза и выявить самое существенное и общее, что характерно для видов, относящихся к одному классу, и наиболее существенное и общее для представителей различных классов животных.

При этом часто при обнаружении того или иного явления у нового вида, взятого для исследования, которое ещё не было обнаружено у видов, изучаемых ранее, все наблюдения по ранее изучаемым видам приходилось повторять заново для того, чтобы выяснить, не была ли допущена ошибка при изучении вновь взятого или ранее взятых видов.

Ядерные структуры при наблюдениях оценивали по размеру, форме, характеру распределения и относительному содержанию в них ДНК. В результате повторных, часто многократных наблюдений мы добивались точной идентификации тех или иных ядерных форм в клетках семенников изучаемых животных.

В общей сложности при исследовании 16-ти выбранных видов животных было приготовлено, окрашено по люминесцентной модификации метода Фельгена, просмотрено в поле зрения цитофлуориметра около **четырёх тысяч препаратов**, получено около **полутора тысяч негативов ядерных форм**, в которых перед фотографированием было предварительно измерено относительное содержание ДНК.

Это позволило нам не только установить действительную последовательность в смене ядерных форм в процессе сперматогенеза и спермиогенеза у изучаемых видов, но и обнаружить те переломные моменты, в которые происходит элиминация половины количества ДНК, содержащейся в сперматоците I-го порядка, при образовании ядер сперматозоидов.

Особенно следует отметить то, что – несмотря на явную недостаточность и односторонность исследования сперматогенеза и спермиогенеза, проведённого нами (практически не исследован биогенез сперматогоний, совершенно не изучены биогенез цитоплазматических органоидов половых клеток, динамика в содержании РНК в ядерных структурах и многие другие важные вопросы), – особенности методического подхода, о которых упоминалось выше, позволили нам выявить целый ряд фактов, неизвестных до настоящего времени в клеточной биологии.

То, что эти факты до настоящего времени не были обнаружены другими исследователями, изучающими сперматогенез и, в частности, мейоз, объясняется, как нам кажется, также в значительной степени и тем, что исследователи, изучающие сперматогенез и мейоз, используют в своих исследованиях методы приготовления препаратов, не отвечающие основным требованиям современного цитологического анализа.

Во-первых, это метод микротомии (идентифицировать ядерные формы на срезах, как показал, в частности и наш опыт работы, чрезвычайно трудно, а порой и невозможно).

Далее, это метод приготовления так называемых «давленных» препаратов, которые совершенно не пригодны для цитофотометрического анализа. При таком методе приготовления препаратов, как мы отмечали ранее [56], из ядерных структур теряется от 15 до 90% ДНК и, кроме того, исследователь в этом случае легко может

принять одни и те же структуры за различные или различные структуры за сходные в силу того, что они различно раздавлены).

И, наконец, метод приготовления препаратов для исследования хромосом в мейозе [79], являющийся по существу модификацией метода Мурхеда [77] и дающий результаты очень сходные с методом приготовления «давленных» препаратов.

Прежде чем перейти к описанию результатов изучения сперматогенеза и спермиогенеза у отдельных изученных нами видов животных, рассмотрим в общем виде то, что известно к настоящему времени о сперматогенезе и спермиогенезе у животных и то, что получено в результате наших наблюдений.

В настоящее время общепризнанной считается следующая схема процесса сперматогенеза и спермиогенеза у животных, которая описана во многих руководствах, монографиях и обзорных статьях [6, 7, 23, 29, 31, 38, 43–45, 64]. Согласно этой схеме, сперматогенез начинается с периода размножения сперматогоний, который заключается в быстро следующих друг за другом митотических делениях диплоидных сперматогоний. На каком-то этапе эти деления приостанавливаются и образовавшиеся в большом количестве диплоидные сперматогонии вступают в так называемый период роста, или в предмейотическую интерфазу, в течение которой происходит увеличение размеров клеток и редупликация ДНК до  $4c$ . По завершении синтеза ДНК сперматогонии, содержащие диплоидный набор хромосом (каждая из которых состоит из двух хроматид), превращаются в сперматоциты I-го порядка, которые вступают в профазу мейоза. Профазу мейоза подразделяют на лептотену (стадию тонких нитей, число которых соответствует

диплоидному набору), зиготену (стадию сливающихся нитей, на которой начинается процесс конъюгации, или синапсис гомологичных хромосом), пахитену (стадию толстых нитей, на которой конъюгация хромосом заканчивается), диплотену (стадия двойных нитей, на которой конъюгирующие хромосомы начинают укорачиваться, начинается отделение друг от друга гомологичных хромосом и становится заметным, что каждая хромосома состоит из двух хроматид) и диакинез (стадия, которая характеризуется большой укороченностью хромосом, возникновением Х-образных фигур – хиазм, исчезновением ядрышка и равномерным распределением бивалентов по ядру). Затем следует метафаза I, анафаза I и телофаза I. За телофазой I следует короткая интерфаза (интеркинез), в течение которой хромосомы в большей или меньшей степени деспирализуются, одеваются ядерной оболочкой. В ядрах сперматоцитов II порядка на этой стадии находят аутосомальные и половые хромоцентры. Затем сперматоциты 2 порядка (содержащие гаплоидный набор хромосом и, соответственно, диплоидный набор хроматид и 2С ДНК) вступают во 2-е деление мейоза, в результате которого образуются 4 гаплоидных сперматиды, содержащие нежно структурированные ядра с аутосомальными и половыми хромоцентрами. В процессе спермиогенеза сперматиды превращаются в зрелые сперматозоиды.

Рассмотрим теперь в наиболее общем виде те принципиально новые факты, которые были обнаружены нами в результате исследования сперматогенеза и спермиогенеза у 16-ти видов животных.

Прежде всего следует отметить, что вопреки прочно утвердившемуся мнению о том, что сперматоциты I-го порядка образуются в результате периода роста

диплоидных сперматогоний, нами обнаружено, что, на самом деле, сперматоциты I-го порядка происходят из генерации высокоплоидных клеток (у различных видов нами была отмечена плоидность таких клеток, варьирующая от  $8n$  до  $20n$ , которая, по-видимому, может быть и ещё выше) в результате их митотического деления (многополюсного, если делятся ядра, плоидность которых выше  $8n$ ). Эти высокоплоидные клетки образуются не из диплоидных, а из тетраплоидных сперматогоний. Вначале мы принимали очень крупные ядра таких высокоплоидных клеток за архигонциты, впервые описанные Вальдейером [24, 43], который считал, по-видимому, эти клетки предшественниками сперматогоний. Однако при дальнейшем более детальном изучении смены ядерных форм в процессе сперматогенеза – у всё большего числа видов животных – стало ясным, что эти высокоплоидные клетки не являются предшественниками сперматогоний, а наоборот – образуются в результате кратного увеличения количества ДНК в ядрах размножившихся тетраплоидных сперматогоний.

Наблюдения показали, что морфология ядер и характер деления таких тетраплоидных сперматогоний последней генерации значительно отличаются у каждого вида от морфологии ядер и характера деления упомянутых высокоплоидных клеток. Ядра размножающихся тетраплоидных сперматогоний представляют собой компактные, сравнительно небольшие образования часто угловатой формы (на фиксированных препаратах), в которых очень тесно расположены относительно длинные и толстые хромосомы. По окончании S периода, в процессе которого количество ДНК удваивается, сестринские хромосомы смещаются относительно друг друга, но далеко не расходятся, и образуют очень близко расположенные друг к другу ядра вновь образовавшихся тетраплоидных сперматогоний, которые разделены очень тонким слоем

цитоплазмы и в которых по-прежнему видны очень тесно расположенные хромосомы (см. фото 1 у различных видов).

По мере размножения – часть тетраплоидных сперматогоний отделяется от общей массы и образует отдельные клетки с круглыми или овальными ядрами. Эти клетки, в свою очередь, вступают в синтетическую интерфазу и образуют упомянутые выше высокоплоидные клетки, которые мы условно назвали просперматоцитами I, так как они являются предшественниками сперматоцитов I-го порядка. По завершении S периода в ядрах образовавшихся просперматоцитов I у животных некоторых видов (например, у *R. ridibunda*, фото 2, стр. 110), можно увидеть короткие, расположенные рядом боком боком сестринские хромосомы, которые в очень высокоплоидных просперматоцитах (выше  $8n$ ) образуют стопки сестринских хромосом.\* Как будет видно из дальнейшего изложения, есть некоторые основания предполагать, что число таких стопок хромосом у видов, для которых характерна конъюгация гомологичных хромосом в мейозе, соответствует гаплоидному набору хромосом. Затем хромосомы в ядрах просперматоцитов тесно прилегают друг к другу и образуются толстые и более длинные хромосомы.

\*) Фотография разбросанных (в результате особенности методики приготовления препаратов) сестринских хромосом просперматоцита I человека приведена в работе Сасаки и Макино [79], в которой авторы относят эти хромосомы к хромосомам полиплоидного сперматогония ( $8n$ ).

В отличие от хромосом сперматоцитов I порядка, в которых у многих видов хорошо выражен хромомерный рисунок (например, стр. 138), хромосомы просперматоцитов I выглядят у тех же видов однородными по длине (фото 2<sub>(1)</sub>, 2<sub>(2)</sub>, стр. 138).

По окончании образования толстых и длинных хромосом происходит митотическое (2-х или многополюсное) деление ядер просперматоцитов I, в результате которого образуются ядра сперматоцитов I порядка, которые по морфологии хромосом могут быть отнесены к ядрам на стадии пахитены (см. фото 3 у различных видов).

Многочисленные наблюдения и цитофлуориметрические измерения показали, что из ядер просперматоцитов I при делении образуется столько ядер сперматоцитов I порядка, во сколько раз относительное содержание ДНК в ядре просперматоцита I больше относительного содержания ДНК в тетраплоидном ядре данного вида. Правда, такие измерения в отдельных опытах мы проводили, как правило, на малых выборках просперматоцитов I (обычно, не больше 3–5 ядер, см., например, данные, приведённые в таблице 1), так как количество интактных ядер просперматоцитов I, которые можно было найти в каждой данной серии препаратов (обычно одновременно окрашивали не более 10-ти препаратов) бывало очень небольшим, что объясняется лёгкой повреждаемостью таких крупных клеток и ядер при приготовлении препаратов. Тем не менее, большое число таких отдельных измерений, хотя и на малых выборках, у изучаемых видов даёт возможность с уверенностью говорить о том, что никакого «досинтеза» ДНК во вновь образовавшихся ядрах сперматоцитов I порядка, которое постулируется некоторыми авторами [29], никогда не происходит.

В некоторых случаях в результате деления высокоплоидных просперматоцитов I (обычно 16-типлоидных) образуются октоплоидные сперматоциты I-го порядка, которые затем, вступая в мейотическое деление, продуцируют диплоидные сперматозоиды (содержащие 2сДНК).



Особенно важно ещё раз отметить то, что образующиеся в результате деления ядер просперматоцитов I ядра сперматоцитов I-го порядка содержат хромосомы, которые по морфологии могут быть отнесены к хромосомам на стадии пахитены.

Гомологичные хромосомы во вновь образовавшихся ядрах сперматоцитов I-го порядка у видов, для которых характерна конъюгация гомологичных хромосом в мейозе, по-видимому, уже попарно конъюгированы (у представителя саранчовых, конька, это можно обнаружить простым подсчётом хромосом, об этом же у других видов животных свидетельствует наличие половых пузырьков в ядрах сперматоцитов I-го порядка, которые, как известно, состоят из конъюгированных половых хромосом) и представлены, судя по содержанию ДНК равному  $8c$  у млекопитающих или  $4c$  у животных других классов, тетрадами.

Конъюгация хромосом, по-видимому, происходит по типу так называемой соматической конъюгации хромосом [40] ещё в ядрах сперматогоний, хромосомы в которых расположены очень тесно друг к другу.

Какого-либо иного пути образования сперматоцитов I-го порядка, кроме как в результате митотических делений высокоплоидных ядер просперматоцитов I мы никогда не наблюдали ни у одного из 16-ти изученных нами видов животных.

Образовавшиеся ядра сперматоцитов I порядка после плазмогамии (или до неё)\* претерпевают морфологические изменения (у некоторых видов отвечающие стадиям диплотены и диакинеза) и вступают в мейотическое деление, которое происходит различно у животных, относящихся к различным классам.

\*) Полной плазмотомии, как следует из наблюдений Фауцетта [72] и наших наблюдений, по-видимому, не происходит у всех популяций клеток, находящихся в

семенных канальцах, и они ещё долго после деления остаются соединёнными плазматическими мостиками. Наличие цитоплазматических мостиков между образовавшимися клетками хорошо видно на препаратах при наблюдениях в люминесцентном микроскопе благодаря слабой автофлуоресценции цитоплазмы.

Естественно, должен возникнуть вопрос, как же произошло, что исследователи, тем не менее, находят и предмейотическую интерфазу (в период которой происходит синтез ДНК до 4с), и стадии лептотену и зиготену (на которых гомологичные хромосомы ещё не конъюгированы или конъюгация только начинается).

Это, по-видимому, объясняется тем, что, как мы уже отмечали выше, поскольку все исследования мейоза, как правило, проводились на так называемых «давленных» препаратах клеток, то отдифференцировать половые клетки от популяций клеток, непосредственно не входящих в линию половых клеток, но всегда присутствующих на препаратах, оказывалось невозможным.

Таковыми клетками у млекопитающих являются плоские эпителиальные клетки семенных канальцев с овальными ядрами (так называемые опорные клетки или клетки Сертоли) и интерстициальные клетки, составляющие соединительную ткань между семенными канальцами, иначе называемые клетками Лейдига. Интерфазные ядра клеток Сертоли и Лейдига на препаратах фиксированных клеток часто очень сходны по морфологии и имеют крупные ядрышки (ядрышки клеток Сертоли обычно несколько мельче).

Эпителиальные клетки Сертоли и клетки Лейдига (которые, по-видимому, образуются из эпителиальных клеток) являются диплоидными клетками и размножаются

митотически. Аналоги этих клеток есть и у представителей других классов животных.

Кроме того, в семенных канальцах животных всегда присутствует популяция гаплоидных клеток, в нежно структурированных ядрах которых отсутствуют чётко выраженные ядрышки, но всегда имеются глыбки ДНП, или так называемые хромоцентры (фото 9 у разных видов). К половому пути эта популяция клеток прямого отношения не имеет, и, по-видимому, несёт в семенниках лиоцитарную функцию.

Такое мнение о функции этих клеток у нас сложилось на том основании, что количество этих клеток резко возрастает в периоды активизации сперматогенеза и спермиогенеза у животных с ясно выраженным половым циклом (птицы, пресмыкающиеся, амфибии)\*. На поперечных срезах семенных канальцев эти клетки расположены преимущественно ближе к просвету канальцев, то есть в той области канальцев, где наиболее активно протекает спермиогенез и где происходит отброс и лизис участков цитоплазмы, часто с включёнными в них элиминируемыми фрагментами ядерного ДНП. Эти клетки мы условно назвали лизирующими клетками. В периоды активизации спермиогенеза лизирующие клетки активно размножаются путём митоза и, по-видимому, в большом числе гибнут.

\*) Количество клеток Лейдига, напротив, резко возрастает тогда, когда спермиогенез приостанавливается, что было отмечено ещё Заварзиным [18].

Из анализа литературных данных [23, 38, 43, 64, 67, 71] и наших собственных наблюдений можно сделать заключение, что исследователи, изучающие мейоз, сперматогенез и спермиогенез у животных, ошибочно принимают профазные ядра клеток Сертоли и Лейдига, хромосомы в которых действительно часто располагаются в

виде так называемого «букета» (фото 10а и 11а указанных видов) за мейотические ядра на стадии лептотены-зиготены\*, более крупные ядра гаплоидных лизирующих клеток в конце S периода, содержащих хромоцентры (фото 9S у некоторых видов) за интерфазные ядра сперматоцитов II -го порядка, профазные и митотически делящиеся ядра гаплоидных лизирующих клеток (фото 9а, 9b, 9с у разных видов) за делящиеся ядра сперматоцитов II-го порядка.

\*) Эта ошибка привела к представлению о том, что сперматоциты I - го порядка образуются в результате периода роста диплоидных сперматогоний, представлению, которое многие годы поддерживает дискуссию о механизме конъюгации гомологичных хромосом в мейоцитах животных.

Но, по-видимому, самой серьёзной ошибкой, которая в известной степени питала вышеприведённые ошибочные представления, следует считать то, что интерфазные ядра гаплоидных лизирующих клеток (нежно структурированные ядра с хромоцентрами) не имеющих прямого отношения к сперматогенезу и спермиогенезу, принимаются исследователями за ядра молодых сперматид.

Благодаря этому возникло совершенно неверное представление о том, что у всех животных, относящихся к любому классу, в результате двух последовательных делений мейоза из ядра сперматоцита I-го порядка образуется четыре сперматиды, превращающиеся затем в четыре зрелых сперматозоида, в то время как на самом деле, и как будет видно из последующего изложения, это имеет место только у млекопитающих. При этом ядра настоящих молодых сперматид у млекопитающих представляют собой сравнительно мелкие ядра с гомогенным распределением в них ДНК (фото 5 у представителей млекопитающих).

В процессе спермиогенеза ядра сперматид увеличиваются в размерах, в них происходит сначала перераспределение ДНП, а затем элиминация половины ДНК, первоначально содержащейся в ядре каждой сперматиды. У представителей других классов животных в результате мейотического деления из ядра сперматоцита I-го порядка в норме образуется не больше 2-х гаплоидных сперматозоидов, а остальная часть ДНП (50%) на том или ином этапе мейоза элиминируется.

Прежде, чем перейти к дальнейшему изложению, необходимо отметить следующее. Если у представителей класса млекопитающих, которые были взяты нами для исследования, в семенниках можно обнаружить клетки на всех стадиях сперматогенеза и спермиогенеза практически в любое время года, то, напротив, у представителей других классов, выбранных нами для исследования, активное протекание сперматогенеза и спермиогенеза довольно строго приурочено к определённому времени года, которое может быть различным у разных видов.

Поэтому, прежде чем приступить к изучению сперматогенеза, необходимо сначала определить период активного его протекания у того или иного вида в данных экологических условиях. Не исключено, что явление элиминации половины количества ДНК в процессе спермиогенеза, которое выражено достаточно откровенно, например, у представителей таких классов как птицы и земноводные (см. ниже), не было обнаружено до настоящего времени только потому, что исследования проводились в периоды приостановки сперматогенеза и спермиогенеза.

После этих общих пояснений и замечаний перейдём к описанию смены ядерных форм в процессе сперматогенеза и спермиогенеза у каждого из изученных нами видов животных.

## ТИП – ХОРДОВЫЕ

### 1. Класс – Млекопитающие

#### *а). Бык (*Bos taurus*). Число хромосом ( $2n$ )=60 [12].*

Материалом исследования служили гениталии взрослых животных, полученных в разное время на Московском мясокомбинате.

Сперматогенез у быка прослежен нами с образования последней генерации тетраплоидных сперматогоний. По мере размножения часть тетраплоидных сперматогоний отделяется от общей массы и образует клетки с круглыми ядрами. Ядра этих клеток вступают в S период, по окончании которого образуется следующая генерация клеток – просперматоциты I. Просперматоциты I у быка, по нашим наблюдениям, обычно октоплоидные (2). Затем происходит митотическое деление просперматоцитов I (2a, 2b, 2c), в результате которого образуются сперматоциты I-го порядка с ядрами (содержащими по 8с ДНК) на стадии, которую можно отнести к стадии пахитены (3). В процессе подготовки к 1-му делению мейоза биваленты в ядре сближаются и образуют очень компактную ядерную форму на стадии метафазы (3a<sub>1</sub>). На фото 3a<sub>2</sub> и 3a<sub>3</sub> показаны ядерные формы на стадии метафазы, но распластанные на предметном стекле при приготовлении препаратов. Затем следует анафаза I (отдельных хромосом в анафазе обычно не видно), телофаза I и цитокинез, и образуются ядерные формы сперматоцитов II-ого порядка (4<sub>(1)</sub>, 4<sub>(2)</sub>). Образуется ли ядерная оболочка у ядерных форм сперматоцитов II-го порядка, – неясно. Во всяком случае, без видимого интеркинеза эти ядерные формы вступают во 2-ое деление мейоза, во время которого отдельные хромосомы также неразличимы (4a, 4b, 4c). Поэтому на светооптическом

уровне 2-е деление мейоза выглядит как простое перетягивание надвое ядерной формы.

Вновь образовавшиеся гаплоидные ядра, каждое из которых содержит  $2c$  ДНК (по отношению к содержанию ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов), вначале расположены рядом ( $5_{(1)}$ ), а затем расходятся к полюсам клетки. В результате цитокинеза образуются две гаплоидные сперматиды.

Ядра вновь образовавшихся сперматид представляют собой сравнительно мелкие ядра с гомогенно распределённой в них ДНК ( $5_{(1)}$ ). Эти ядра совершенно не похожи на интерфазные гаплоидные ядра лизирующих клеток ( $9_{(2)}$ ). Ядра лизирующих клеток на препаратах несколько крупнее, в них видна нежная хроматиновая сеть и несколько каплевидных хромоцентров.

Как мы отмечали выше, именно ядра гаплоидных лизирующих клеток некоторые авторы [67, 68, 69] в своих исследованиях спермиогенеза у быка ошибочно принимали за ядра круглых сперматид, что явилось причиной ряда других ошибок. На фото  $9_{(1)}$ ,  $9S$  представлены наряду с интерфазными ядрами и более крупные ядра гаплоидных лизирующих клеток в конце S периода, также содержащие хромоцентры, которые до настоящего времени ошибочно принимают за интерфазные ядра сперматоцитов II-го порядка. На фото  $9a$  и  $9b$  представлены соответственно анафаза и телофаза делящихся ядер гаплоидных лизирующих клеток.

Преобразование ядра вновь образовавшейся сперматиды у быка, приводящее к образованию ядра зрелого сперматозоида, начинается с увеличения размеров ядра ( $5_{(2)}$ ) и его удлинения (образования ядра, так называемой продолговатой сперматиды). В это же время в ядре происходит перераспределение ДНК, в процессе которого одна часть ДНК равномерно распределяется в передней области ядра будущего сперматозоида, а другая часть ДНК

концентрируется в противоположной области, ближе к шейке будущего сперматозоида (5a – 5e).

По окончании процесса перераспределения ДНК на стадии превращения ядра продолговатой сперматиды, представленной на фото 5f<sub>1</sub> и 5f<sub>2</sub>, начинается постепенная элиминация той части ДНК, которая сконцентрирована в задней области ядра (6<sub>(1)</sub>), и развитие хвоста сперматозоида. Элиминация половины количества ДНК, первоначально содержащегося в ядре продолговатой сперматиды, завершается в сперматозоидах, вытесненных к центру семенного канальца.

В ядрах зрелых сперматозоидов часто можно видеть тёмную поперечную полосу (участок ядра, обеднённый ДНК). Этой полосой (7<sub>(1)</sub> и 7<sub>(2)</sub>) отмечена граница между задней областью ядра продолговатой сперматиды, в которой была сконцентрирована элиминируемая затем часть ДНК (5f<sub>1</sub> и 5f<sub>2</sub>) и передней областью, в которой другая часть ДНК была равномерно распределена.

В редких случаях, при нарушении процесса перераспределения ДНК в ядре сперматиды, в центральной или проксимальной области ядра зрелого сперматозоида видна сохранившаяся капля ДНК (6<sub>(2)</sub>), которая не была элиминирована в результате того, что элиминация ДНК происходит только в заднем конце ядра продолговатой сперматиды. Содержание ДНК в таких ядрах несколько превышает (на 10–15%) величину 1с.

На препаратах клеток семенников быка можно встретить более крупные ядра зрелых диплоидных сперматозоидов, содержащие 2сДНК, которые, как показали наши наблюдения, образуются из сперматоцитов II-го порядка. При этом, как и при образовании гаплоидных сперматозоидов, ядра сперматоцитов II-го порядка (у них вначале формируется ядерная оболочка) сначала увеличиваются в размере и удлиняются, затем в них

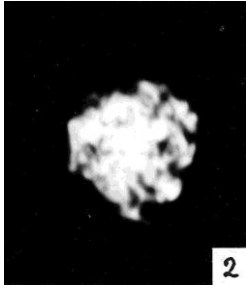


происходит перераспределение ДНК и элиминация половины количества ДНК.

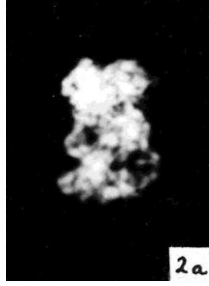
Нарушений в процессе спермиогенеза, которые приводили бы к образованию хвостатых сперматозоидов без элиминации половины количества ДНК из ядер сперматид, мы не наблюдали ни у одного из быков.

Наряду с ядерными формами клеток, находящимися на различных стадиях сперматогенеза и спермиогенеза, на препаратах семенников быка всегда в значительном количестве присутствуют диплоидные ядра эпителиальных клеток семенных канальцев (10) и интерфазные, и делящиеся ядра интерстициальных клеток (11, 11S, 11a<sub>1</sub>–11c). На фото 11S представлено ядро интерстициальной клетки, находящееся в S периоде, на фото 11a<sub>1</sub>, профазное ядро (4n, 8c) интерстициальной клетки, хромосомы которого образуют характерную фигуру «букета» (на фото 11a<sub>2</sub> такое же профазное ядро, только сильно распластанное на стекле). Эти ядерные формы делящихся интерстициальных клеток до настоящего времени ошибочно принимают соответственно: за стадию «роста» ядер сперматоцитов 1-го порядка и за стадию «лептотены». Анафаза митоза этих клеток представлена на фото 11b<sub>1</sub> и 11b<sub>2</sub>, телофаза на фото 11c.

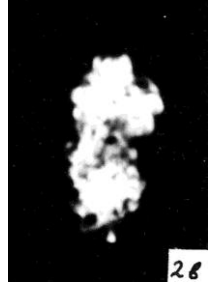
*Bos taurus L.*



2



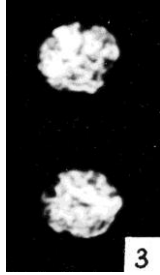
2a



2b



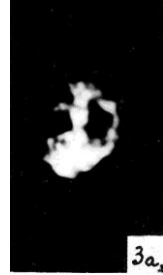
2c



3



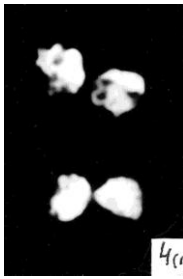
3a<sub>1</sub>



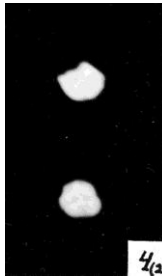
3a<sub>2</sub>



3a<sub>3</sub>



4(1)



4(2)



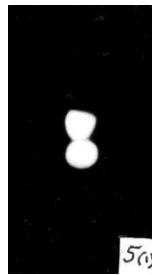
4a



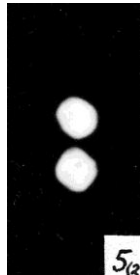
4b



4c

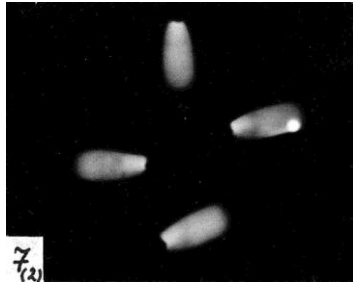
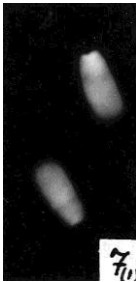
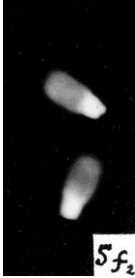


5(1)

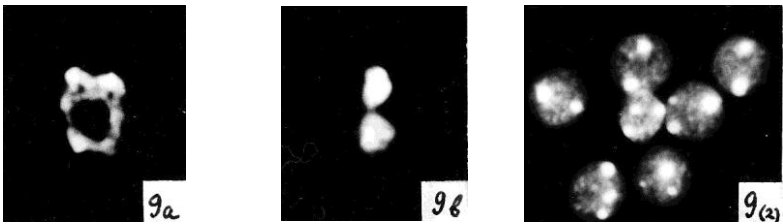
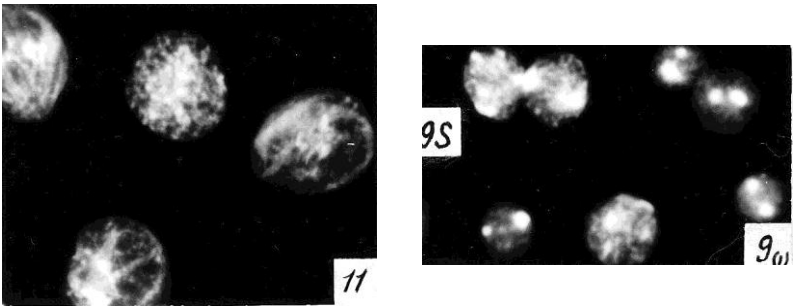
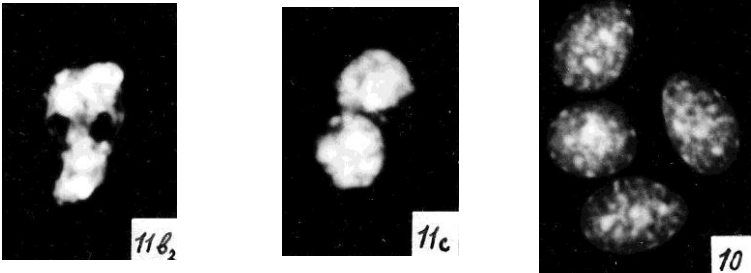
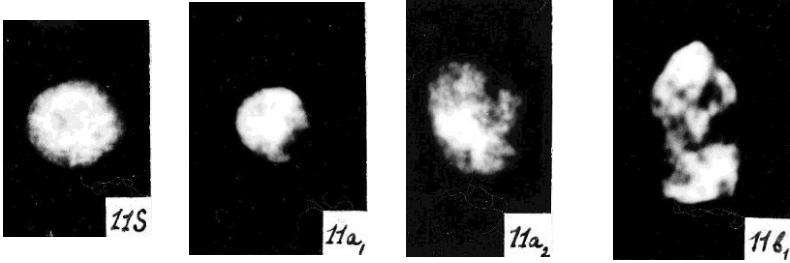


5(2)

*Bos taurus L.*



*Bos taurus L.*



**б). Морская свинка (*Cavia sobaya*).  $2n=64$  [12]**

Материал для исследования был взят в разное время от 6-ти лабораторных животных.

Сперматогенез у морской свинки прослежен с образования последней генерации тетраплоидных сперматогоний. На фото 1 представлены два ядра последней генерации тетраплоидных сперматогоний. На фото 2 октоплоидное ядро просперматоцита I после завершения S периода ( $8n$ ,  $16сДНК$ ). На фото 2а и 2б представлены стадии деления октоплоидных ядер просперматоцитов I, приводящего к образованию ядер сперматоцитов I-го порядка на стадии пахитены (3), содержащих по  $8с$  ДНК. У морской свинки, как и у быка, в процессе подготовки к 1-му делению мейоза биваленты в ядре сближаются и образуют очень компактную ядерную форму на стадии метафазы ( $3a_1$ ). На фото  $3a_2$  представлена такая же метафаза, но сильно распластанная на предметном стекле, благодаря чему видны отдельные биваленты.

Затем следуют анафаза I, фото  $3b_1$  (на фото  $3b_2$  такая же анафаза, но распластанная), телофаза I, и образуются ядерные формы сперматоцитов II-го порядка (4). В процессе подготовки ко 2-му делению мейоза ядерные формы сперматоцитов II-го порядка уплотняются (4а). Затем следуют анафаза II (4б) и телофаза II. В результате образуются два гаплоидных, расположенных тесно друг к другу гомогенных ядра сперматид (5). На этой же фотографии внизу представлено нежно структурированное ядро гаплоидной лизирующей клетки (содержащей  $2сДНК$ ) с крупным центральным хромоцентром ( $9_{(1)}$ ).

У морской свинки цитокинеза во 2-м делении мейоза обычно не происходит (часто цитокинеза не происходит и в 1-м делении мейоза) и оба ядра (часто и все четыре) сперматид лежат в общей цитоплазме вплоть до

образования ядер зрелых сперматозоидов (а также до формирования акросом и хвостов у сперматозоидов, см. фото 5d<sub>(2)</sub>), когда цитоплазма, окружающая ядра, наконец, резорбируется.

Превращение вновь образовавшихся ядер сперматид у морской свинки, приводящее к образованию ядер зрелых сперматозоидов, как и у быка, начинается с увеличения размеров ядер и перераспределения в них ДНК (5a–5c). Как видно на приведённых фотографиях, одно из двух ядер сперматид, находящихся в общей цитоплазме, несколько обгоняет другое в своих превращениях. В результате перераспределения ДНК, часть ДНК концентрируется в области ядра, в которой впоследствии образуется хвост сперматозоида и в которой происходит постепенная элиминация ДНК. На фото 6 представлено одно из ядер сперматид, находящееся в общей цитоплазме с другим ядром, в котором в результате элиминации содержание ДНК снизилось приблизительно на 20% от 2с ДНК.

По окончании элиминации половины ДНК, первоначально содержащейся в ядре сперматиды, часть сконцентрированной ДНК в области прикрепления хвоста сперматозоида остаётся и в ядрах зрелых сперматозоидов (7<sub>(1)</sub>). Иногда среди ядер зрелых сперматозоидов (из семявыносящего протока) можно встретить ядра, около которых расположены слабо связанные с ядром элиминируемые тельца, содержащие ДНК (ядро в центре на фото 7<sub>(1)</sub>).

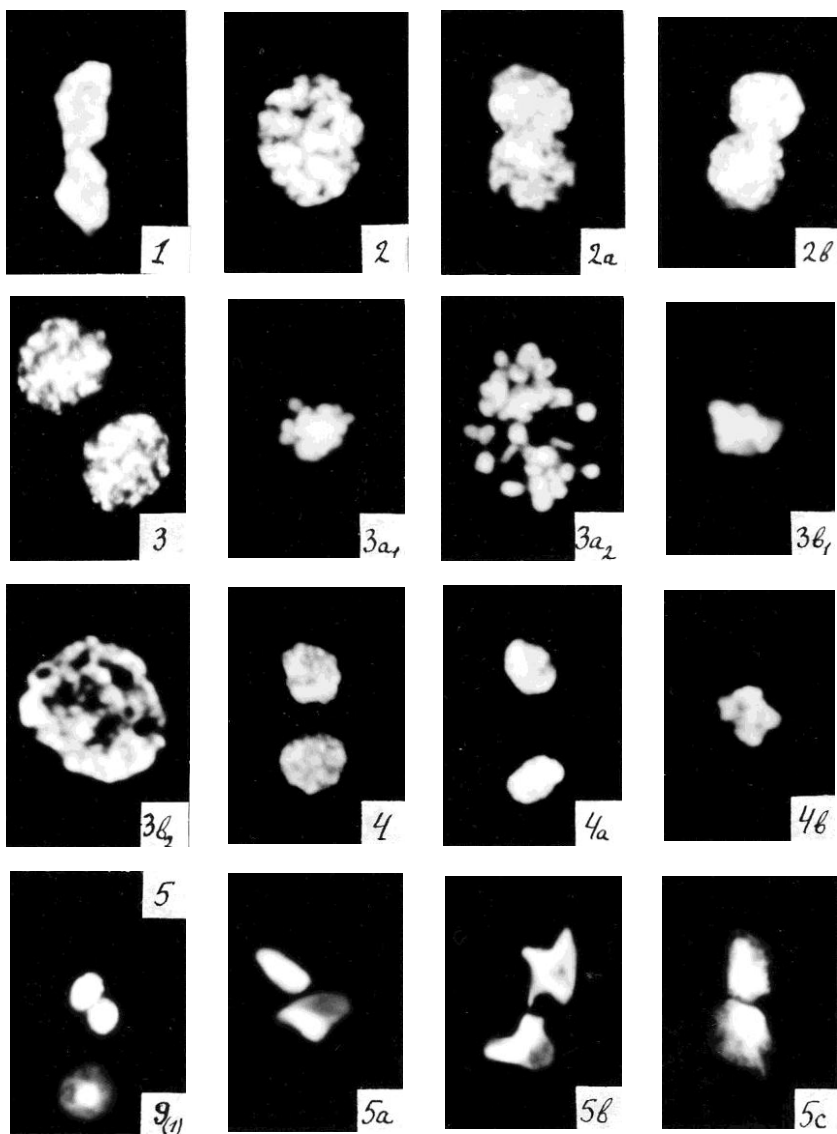
У морской свинки, как и у быка, нами отмечено образование диплоидных сперматозоидов (7<sub>(2)</sub>), содержащих 2сДНК, которые образуются из ядер сперматоцитов II-ого порядка.

На фотографии 9<sub>(2)</sub>, 10 представлены два интерфазных гаплоидных ядра лизирующих клеток (9<sub>(2)</sub>) и два диплоидных ядра эпителиальных клеток (10) на фото 9<sub>(3)</sub> интерфазные ядра гаплоидных лизирующих клеток с

хромоцентрами. На фото 9а профазное ядро гаплоидной лизирующей клетки, на фото 9b метафаза, на фото 9с и 9d соответственно более ранняя и более поздняя телофаза. На фото 11а представлены два профазных ядра интерстициальных клеток (4n, 8сДНК), на фото 11 интерфазное ядро интерстициальной клетки (2n, 4с).

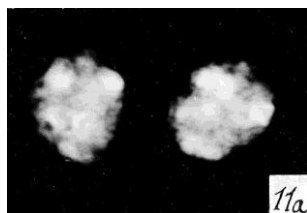
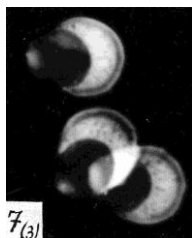
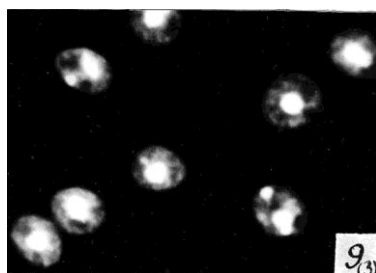
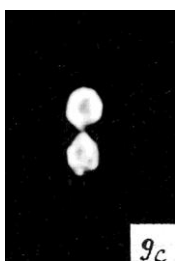
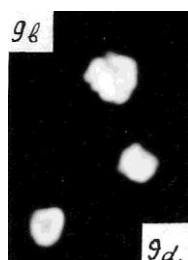
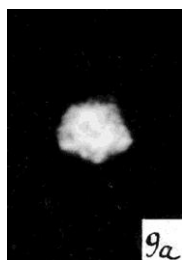
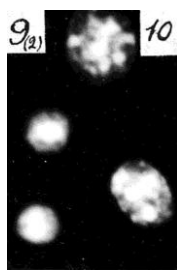
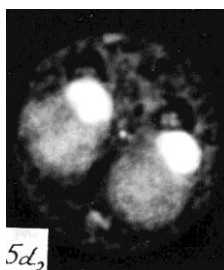
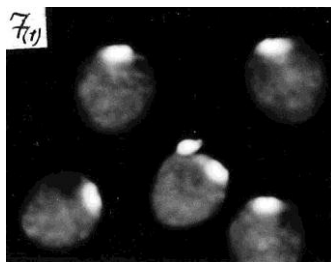
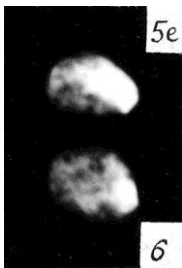
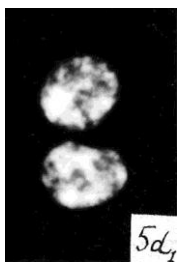
И, наконец, на фотографии 5d<sub>2</sub> (на которую мы уже ссылались выше) представлены два ядра сперматид (на стадии, соответствующей фото 5d<sub>(1)</sub>) в общей цитоплазме. На этой фотографии видно начало образования акросом на поверхности ядер сперматид. На фото 7<sub>(3)</sub> представлены сформированные акросомы зрелых сперматозоидов морской свинки. Последние две фотографии получены с препаратов клеток, которые были предварительно сульфатированы (по методу, применённому нами ранее [55]) и затем окрашены по люминесцентной модификации метода Фельгена с применением риванола. В процессе сульфатирования из ядер была удалена значительная часть ДНК, но акросомы и окружающая ядра сперматид цитоплазма (но не хвосты зрелых сперматозоидов) приобрели способность связывать основной краситель.

*Cavia cobaya L.*





*Cavia cobaya* L.



**в). Мышь (*Mus musculus*).  $2n = 40$  [12].**

Материал для исследования был взят в разное время от 6-ти серых лабораторных мышей.

Сперматогенез у мыши прослежен нами, как и у предыдущих видов, с образования последней генерации тетраплоидных сперматогоний. На фото 1 представлена группы из 4-х ядер таких сперматогоний. По мере размножения тетраплоидные сперматогонии отделяются от общей массы, вступают в S период и образуют просперматоциты I (2). У мыши нами были отмечены октоплоидные (2) и 12-ти-плоидные ядра просперматоцитов I. Затем происходит митотическое деление ядер просперматоцитов I (2а, 2в), которое может быть двухполюсным (при делении октоплоидных ядер) или трёхполюсным (при делении 12-ти-плоидных ядер) и в результате которого в общей цитоплазме образуются два ( $3_{(1)}$ ) или три ( $3_{(2)}$ ) ядра сперматоцитов I-го порядка (содержащие по 8сДНК) на стадии, которую можно отнести к стадии пахитены.

В процессе подготовки к 1-му делению мейоза, биваленты в ядрах сперматоцитов I-го порядка (образовавшихся в результате цитокинеза, который у мыши обычно происходит) утолщаются, сближаются (3а<sub>1</sub>) и образуют компактную ядерную форму на стадии метафазы (3а<sub>2</sub>). На фото 3а<sub>3</sub> представлена такая же ядерная форма, но распластанная на предметном стекле (видны отдельные биваленты). Затем следует анафаза I (3в) и телофаза I (4), в результате которой образуются гомогенные ядерные формы сперматоцитов II-го порядка, расположенные вначале тесно друг к другу. После этого ядерные формы сперматоцитов II-го порядка расходятся к полюсам клетки и после цитокинеза вступают во 2-е деление мейоза, во время которого отдельные хромосомы неразличимы, и

поэтому 2-е деление мейоза выглядит как простое перетягивание надвое ядерной формы.

Образовавшиеся гаплоидные ядра, вначале расположенные рядом ( $5_{(1)}$ , наверху фото), затем расходятся к полюсам клетки ( $5_{(1)}$ , внизу). Цитокинез, как и у морской свинки, происходит не всегда.

На фото  $5_{(1)}$  (наверху) представлена телофаза 2-го деления мейоза, в процессе которого от одного из вновь образовавшегося гаплоидного ядра отщепляется микроядро. Такие случаи в результате 2-го деления мейоза мы иногда встречали у всех четырёх исследованных нами представителей млекопитающих. Осталось невыясненным, представляет ли отщепление такого микроядра случай резко выраженной элиминации части ядерного материала из ядра сперматиды или отклонение от нормального деления, приводящего к образованию абортивной сперматиды.

Вновь образовавшиеся ядра сперматид представляют собой круглые ядра с гомогенно распределённой в них ДНК ( $5_{(1)}, 5_{(2)}$ ). Для сравнения на фото  $5_{(2)}$ , наверху, представлено интерфазное гаплоидное ядро (9) лизирующей клетки с нежной хроматиновой сетью и центральным хромоцентром.

Преобразование ядер сперматид, приводящее к образованию ядер зрелых сперматозоидов, начинается с того, что ядра теряют круглую форму (5a) и увеличиваются в размерах (5b, 5c, 5d). Одновременно с этим в них происходит перераспределение ДНК. По окончании этих процессов в ядрах сперматид, приобретших копьевидную форму, видны равномерно распределённые глыбки ДНК (5d). С этой стадии из ядер сперматид начинается постепенная элиминация ДНК, и формирование хвоста сперматозоида.

Как и у быка, и морской свинки – у мыши элиминация половины количества ДНК происходит в той области ядра

сперматиды, около которой расположено основание хвоста сперматозоида. По окончании процесса элиминации ДНК, образовавшиеся ядра зрелых сперматозоидов, приобретших форму полумесяца с одним срезанным концом (в области прикрепления хвоста), имеют характерное расположение ДНК: концентрация ДНК выше в области прикрепления хвоста сперматозоида и постепенно снижается к краям ядра (7). Ядра зрелых сперматозоидов несколько мельче ядер сперматид на стадии, с которой начинается элиминация ДНК.

На фотографии 9S представлено ядро лизирующей клетки в S периоде, по окончании которого могут образоваться профазные ядра, содержащие 4с или 8с ДНК. На фото 9а представлены две метафазы лизирующих клеток (содержащих по 4сДНК), на фото 9b<sub>1</sub> – анафаза лизирующих клеток, содержащая 4сДНК, на фото 9b<sub>2</sub> – анафаза лизирующих клеток, содержащая 8сДНК (по окончании деления в последнем случае образуются сразу четыре гаплоидных ядра лизирующих клеток в общей цитоплазме).

На фотографии 11<sub>(1)</sub> представлено интерфазное диплоидное ядро молодой интерстициальной клетки, на фото 11<sub>(2)</sub> – диплоидные интерфазные ядра более старых интерстициальных клеток, внизу (в середине фото) ядро интерстициальной клетки в S периоде. На этой же фотографии представлены и профазные ядра интерстициальных клеток (содержащих по 8сДНК), в некоторых из этих ядер хромосомы образуют характерную фигуру «букета» (11а). На фотографии 11b представлена анафаза митоза интерстициальных клеток у мыши.

Фотография 11b и все фотографии на страницах 72, 73 получены с поперечных срезов семенников мыши (толщина срезов 15μ). Ядерные формы на этих фотографиях обозначены главными цифрами, без букв и дополнительных цифр (см. таблицу 5).

На фото 10 представлены диплоидные ядра клеток эпителия семенных канальцев, на фото 11 – ядра интерстициальных клеток. В следующем ряду – фотография сегмента семенного канальца (поперечный срез). На этой фотографии (слева) ядра эпителиальных клеток семенного канальца (10), правее – срезы, по-видимому, ядер сперматоцитов I-ого порядка (3). На следующей фотографии, слева, – по-видимому, делящиеся ядра эпителиальных клеток (10), правее, – по-видимому, ядра просперматоцитов I и сперматоцитов I-ого порядка (2, 3). На предпоследней фотографии, слева вверху продолговатое ядро эпителиальной клетки, слева внизу интерфазные и делящиеся ядра интерстициальных клеток (10, 11), в центре слева – ядра просперматоцитов I, в центре правее – ядра сперматоцитов I-ого порядка (2, 3), справа, ближе к просвету семенного канальца – ядра лизирующих клеток (9).

На последней фотографии, слева – ядра эпителиальных клеток (10), правее вверху – ядро (яркое) просперматоцита I (2), ещё правее – ядра лизирующих клеток (9), справа – ядра сперматид на различных стадиях, справа в верхнем углу, над ядром сперматиды с равномерно распределенными глыбками ДНК, ядро зрелого сперматозоида, изображение которого несколько дефокусировано (5, 7).

Картины распределения ядерных форм в семенном канальце на поперечных срезах зависят от того, как прошёл срез, в каком месте семенного канальца прошёл срез и от того, какие ядерные формы расположены в плоскости, на которую сфокусирован микроскоп. Поэтому общую картину распределения ядерных форм в семенном канальце от периферии к центру можно воссоздать, с большей или меньшей точностью, только при анализе многих срезов (конечно, при том неременном условии, что ядерные формы были предварительно детально изу-

чены на препаратах целых клеток при цитофлуориметрическом контроле).

В связи с рассмотрением смены ядерных форм в процессе сперматогенеза и спермиогенеза у мыши следует остановиться на работе Агроскина, Бродского и Папаяна [1], в которой в качестве стандарта для проверки цитофотометров предложены окрашенные по методу Фельгена клетки из семенников мыши. Эта работа привлекла наше внимание потому, что в ней допущены серьезные ошибки, связанные с незнанием объекта исследования.

На микрофотографиях ядер, приведённых в рассматриваемой работе [1], представлены три ядерные формы, которые авторы определяют как ядро спермия\* (фото 1 на рис. 1) , ядро сперматиды (фото 2 на рис. 1) и ядро соматической клетки (фото 3 на рис. 1).

\*) Спермиями называют мужские половые клетки в микроспорочитах или в пыльцевых трубках высших растений, у животных мужские половые клетки принято называть сперматозоидами.

На самом же деле авторы [1] на фото 1 (рис. 1) представили не ядро сперматозоида, а ядро сперматиды на последней стадии перераспределения ДНК (фото 5d в нашей монографии), которое содержит 2сДНК; на фото 2 (рис. 1) – не ядро сперматиды, а интерфазное диплоидное ядро молодой интерстициальной клетки, содержащей 4сДНК; на фото 3, рис. 1 авторы представили действительно ядро соматической клетки, это интерфазное диплоидное ядро более старой интерстициальной клетки, также содержащей 4сДНК. Если авторы действительно измеряли относительное содержание ДНК в таких ядрах (на трёх различных цитофотометрах) и получили при этом отношение в содержании, как выражаются авторы, «ДНК-фуксина» для таких ядер близкое к отношению 1:1:2, вме-

сто отношения, близкого к 1:2:2, которое они должны были получить для таких ядер, то это вызывает недоумение.

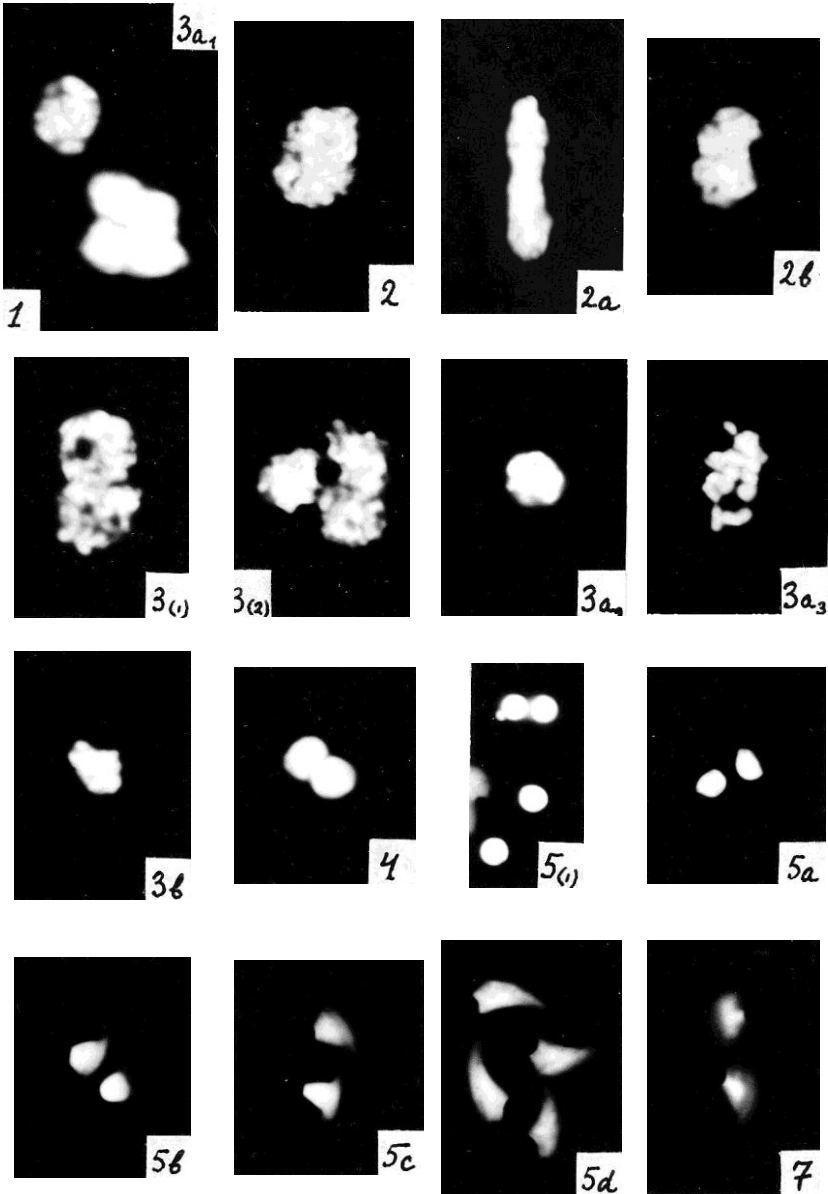
Совершенно очевидно, однако, что авторы этой работы – ядер настоящих сперматид мыши не знают.

\*) Получаемый окрашенный продукт представляет собой не комплекс ДНК и фуксина, а соединение апуриновой ДНК с красителем. Поэтому, по-видимому, правильнее говорить об относительном содержании ДНК в тех или иных формах, о котором мы судим опосредовано, определяя относительные количества прореагировавшего красителя с апуриновой ДНК.

Ядра зрелых сперматозоидов мыши, которые наверняка также присутствовали на препаратах, авторы, по-видимому, не измеряли, принимая их, возможно, за разрушенные ядра.

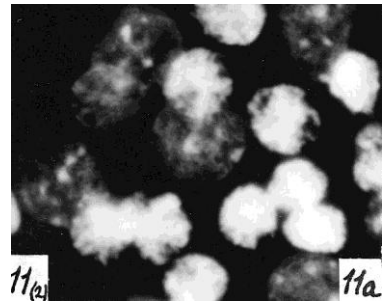
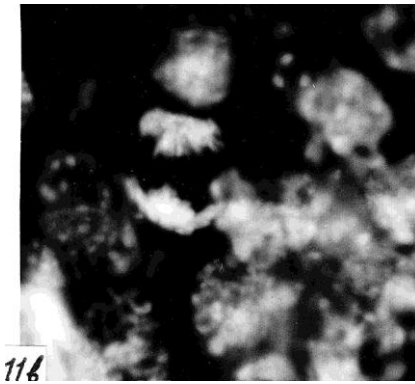
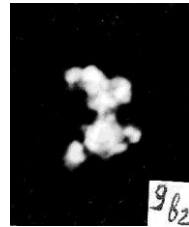
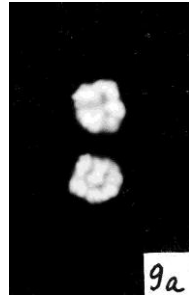
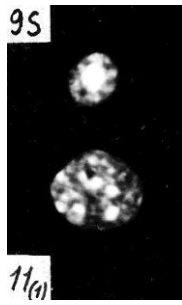
Вызывает возражение и выбор способа фиксации клеток. Авторы использовали, по нашему мнению, наихудший (из возможных) способов фиксации клеток для последующего окрашивания по методу Фельгена: сначала высушивание отпечатков клеток на воздухе, затем обработка их в этиловом спирте. На требованиях, предъявляемых к фиксации клеток для последующего окрашивания по методу Фельгена мы останавливались ранее [51, 52, 54] и поэтому здесь их обсуждать не будем. Во всяком, случае выбор способа фиксации клеток и выбор измеряемых ядерных форм в рассматриваемой работе [1] сводит на-нет рассуждения авторов об особенностях гидролиза в «спермиях» и «сперматидах». Те же, в сущности, ошибки допущены и в работе Даниловой с соавторами [10] при измерении «ДНК-фуксина» в ядрах гепатоцитов и сперматозоидов мыши.

*Mus musculus L.*

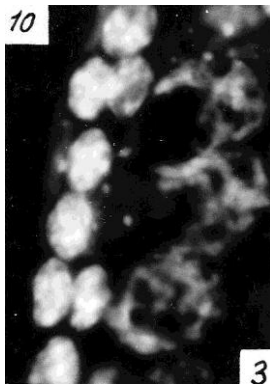
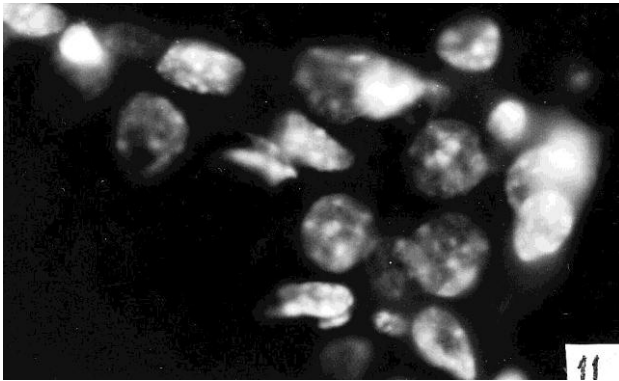
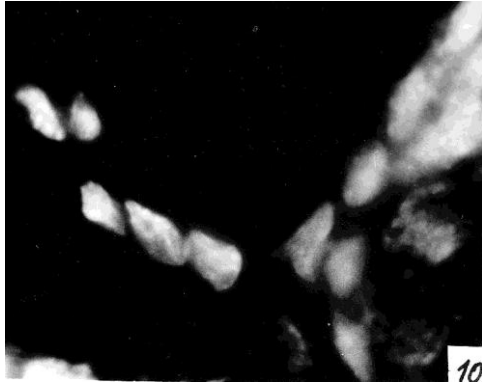




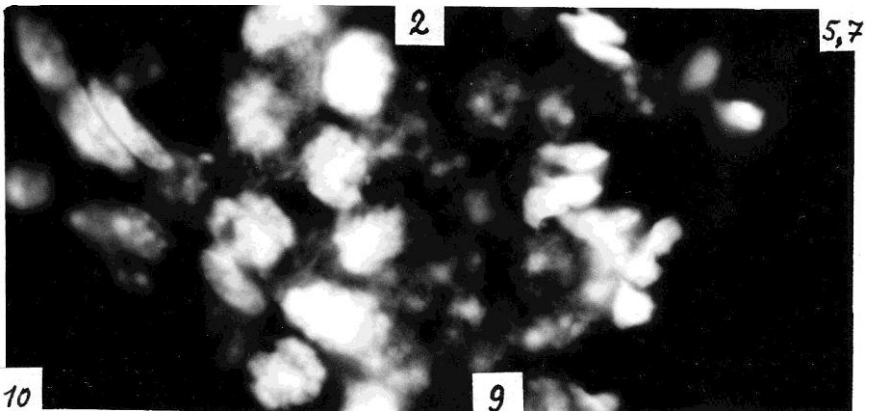
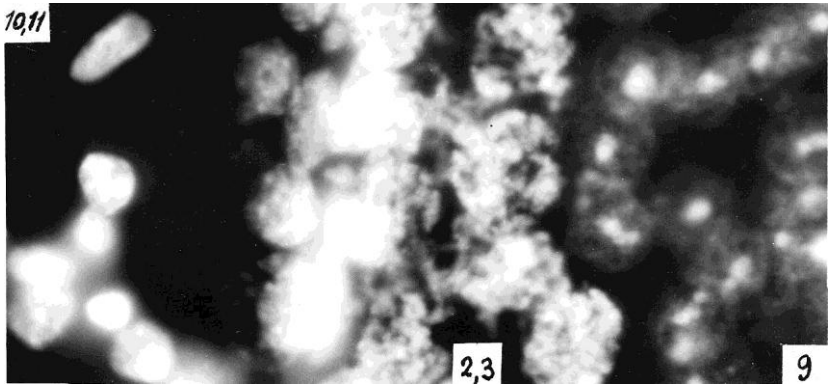
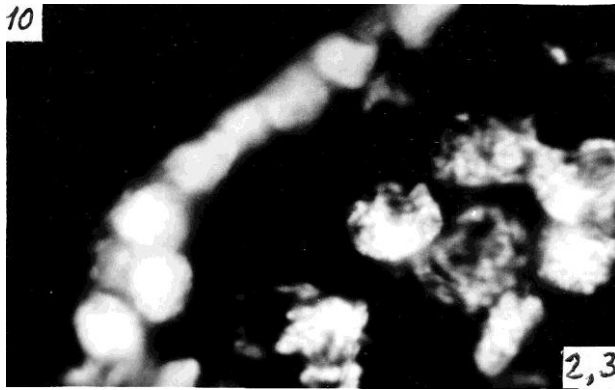
*Mus musculus L.*



*Mus musculus L.*



*Mus musculus L.*



## 2). Человек (*Homo sapiens*). $2n = 46$ .

Материалом исследования служил биопсийный материал, взятый от двух пациентов (19-ти и 20-ти лет) больных транссексуализмом (психическое заболевание, проявляющееся в том, что пациенты стремятся превратиться в особой женского пола)\*. Кроме этого, в качестве контроля материалом исследования служили зрелые сперматозоиды из спермы, полученной от заведомо фертильных мужчин.

\*) Биопсийный материал был любезно предоставлен нам доцентом кафедры оперативной хирургии Университета дружбы народов В. И. Васильевым. В. И. Васильевым также даны сведения о характере заболевания пациентов, у которых был взят биопсийный материал.

Наши наблюдения показали, что у одного из пациентов протекание процессов сперматогенеза и спермиогенеза хорошо соответствует протеканию этих процессов у других исследованных нами представителей класса млекопитающих и приводит к образованию нормальных зрелых сперматозоидов, которые неотличимы от контрольных по морфологии и относительному содержанию ДНК.

В этом случае сперматогенез у человека прослежен нами с образования ядер сперматоцитов I-го порядка в результате деления октоплоидных ядер (содержащих  $16сДНК$ ) просперматоцитов I (2a). Ядра вновь образовавшихся сперматоцитов I-го порядка (содержащие по  $8сДНК$ ) всегда находятся на стадии, соответствующей стадии пахитены (3). В процессе подготовки к 1-ому делению мейоза, биваленты в ядре укорачиваются (3a), сближаются и образуют компактную ядерную форму на стадии метафазы. На фото  $3b_1$  и  $3b_2$  представлены распластанные на предметном стекле ядерные формы на стадии метафазы I, в которых хорошо видны отдельные

биваленты. Затем следует анафаза I (3с), телофаза I (3d) и цитокинез, который всегда запаздывает, так как образующиеся ядра сперматоцитов II-ого порядка в ранней телофазе расположены близко друг к другу. В образовавшихся ядерных формах сперматоцитов II-ого порядка (даже сильно распластанных на предметном стекле) отдельные хромосомы неразличимы. Без видимого интеркинеза ядерные формы сперматоцитов II-ого порядка вступают во 2-ое деление мейоза (4а), которое внешне выглядит как простое перетягивание надвое ядерной формы.

Вновь образовавшиеся гаплоидные ядра (каждое из которых содержит 2сДНК) вначале расположены рядом (5), а затем расходятся к полюсам клетки. В результате цитокинеза образуются две гаплоидные круглые сперматиды, имеющие сравнительно мелкие и гомогенные ядра.

Превращения ядер сперматид начинается с увеличения размеров ядер (5а). Затем ядра принимают овальную форму, слегка заострённую в той области ядра, к которой будет примыкать хвост будущего сперматозоида (5b).

С этого момента начинается элиминация половины количества ДНК, содержащегося в ядре, и постепенное уменьшение размеров ядра. При этом область ядра, около которой формируется акросома, постепенно обедняется ДНК (6). Одновременно с элиминацией половины количества ДНК идёт образование хвоста и акросомы сперматозоида. Примерно, у пятидесяти процентов ядер зрелых сперматозоидов на препаратах, в передней области ядер видны маленькие полости (по одной в каждом ядре) обеднённые ДНК (7<sub>(1)</sub>), которые, возможно, содержат кислые мукополисахариды [55], и присутствие которых, по мнению некоторых авторов [62], указывает на наличие в таких ядрах у-хромосомы. На фото 7<sub>(3)</sub> представлены ядра зрелых сперматозоидов человека, окрашенных акрихин-

ипритом на препаратах, заключённых в буферный раствор (рН 7,0). На этой фотографии в одном из ядер (наверху) видно светящееся у-тельце (в результате набухания в водном растворе ядра сперматозоидов увеличены в размере по сравнению с ядрами на препаратах, заключённых в неводную среду, сравните фото 7<sub>(1)</sub>, 7<sub>(2)</sub>).

Иногда на препаратах можно встретить ядра сперматозоидов, содержащие 1сДНК, около которых расположены отщепившиеся от ядер микроядра (7<sub>(2)</sub>, вверху). Осталось невыясненным, образуются ли нормальные сперматозоиды в случае столь резко выраженной элиминации ДНК.

На фото 11а представлено профазное ядро интерстициальной клетки (содержащее 8сДНК), на фото 11 – интерфазное диплоидное ядро интерстициальной клетки. На фото 10 – интерфазное диплоидное ядро эпителиальной клетки семенных канальцев. На фото 9 представлены интерфазные ядра гаплоидных лизирующих клеток (содержащие по 2сДНК), в которых видны нежная хроматиновая сеть и несколько каплевидных хромоцентров разной величины. На фото 9а представлены два профазных ядра лизирующих клеток (содержащие по 4сДНК), в которых также видны каплевидные хромоцентры. На фото 9b<sub>1</sub>, 9b<sub>2</sub> и 9b<sub>3</sub> представлены распластанные на предметном стекле ядерные формы лизирующих клеток на стадии метафазы, в которых видны отдельные пары расположенных рядом сестринских хромосом. Подсчёт таких пар хромосом в каждой метафазе при микроскопировании показал, что их число равно 23. Такие пары сестринских хромосом в делящихся ядрах лизирующих клеток некоторые авторы ошибочно принимали за сестринские хромосомы в интеркинезе 2-ого деления мейоза\* (см. фото 10 в работе [79] и рис. 35 в работе [71], а профазные ядра лизирующих клеток за ядра сперматоцитов I-ого порядка на стадии лептотены (см. фиг. 7 в работе [79]).

\*) Как отмечалось выше, в распластанных ядерных формах сперматоцитов 11-ого порядка у человека отдельные хромосомы не видны.

Следует отметить и досадную ошибку в работе Эберле [71]. Так, в объяснении к рис. 40 (стр. 51) в этой работе утверждается, что на фотографии изображены ядра сперматид человека, в то время как на самом деле на фотографии представлены два интерфазных ядра лизирующих клеток и пять ядер зрелых сперматозоидов крысы.

Изучение сперматогенеза и спермиогенеза у другого пациента дало результаты, хорошо соответствующие результатам, полученным Эберле [71] при исследовании сперматогенеза и спермиогенеза у больных дистрофической миотонией (*dystrophischer myotonic*).

В этом случае (стр. 81) сперматогенез прослежен нами с ядерных форм сперматоцитов I-ого порядка (содержащих 8сДНК относительно содержания ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов фертильных мужчин), фото 3.

В процессе подготовки к делению содержимое этих ядер, имеющих неопределённую структуру, уплотняется (3a) и распадается (3b и 3c) на две – чаще неравные – части ( $4_{(1)}, 4_{(2)}$ ). Затем – образовавшиеся ядерные формы также распадаются на две части и образуется тетрада ядер, каждое из которых содержит случайное количество ДНК ( $5_{(2)}$ ). Реже образуется тетрада ядер, содержащих равные количества ДНК ( $5_{(1)}$ ). Однако, и в том и другом случаях образовавшиеся в результате цитокинеза сперматиды ( $5_{(3)}$ ) подвергаются лизису и постепенно распадаются ( $5_{(4)}$ ).

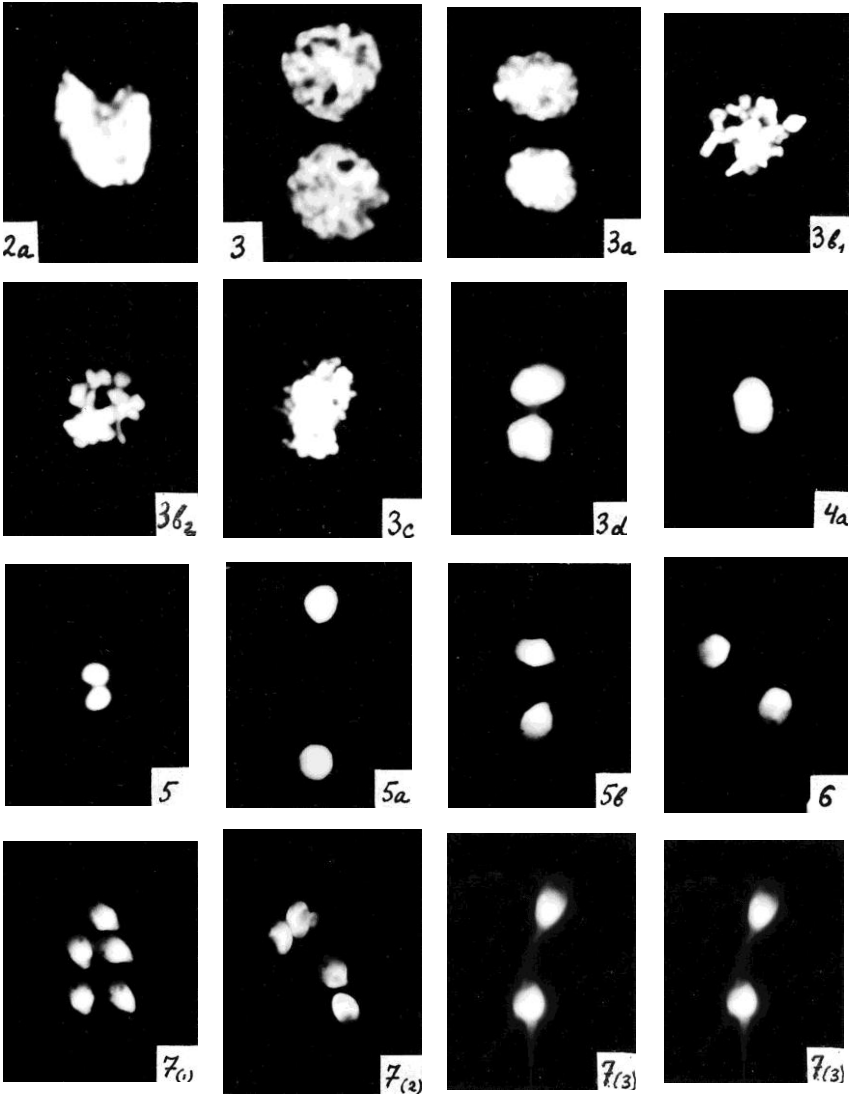
Таким образом, в норме в результате двух последовательных делений мейоза у млекопитающих образуется четыре гаплоидных сперматиды, из ядер которых в процессе спермиогенеза элиминируется половина количества ДНК.

Поскольку ядра половых клеток, встречающихся при оплодотворении, по-видимому, должны содержать одинаковые количества ДНК (для нормального протекания их слияния при образовании ядра зиготы), возможно, что у млекопитающих слияние ядер половых клеток наступает только после того, как в ядре сперматозоида количество ДНК вновь удваивается. Этот вопрос требует специального исследования.

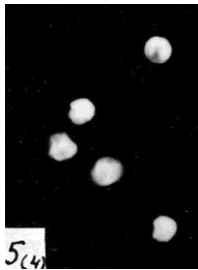
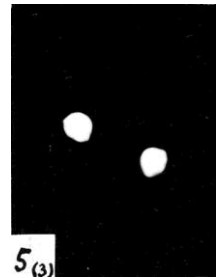
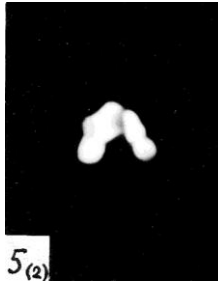
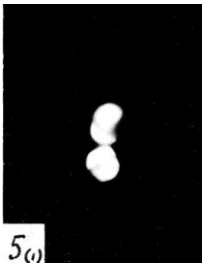
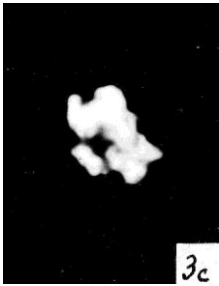
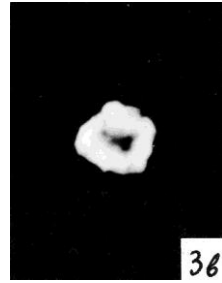
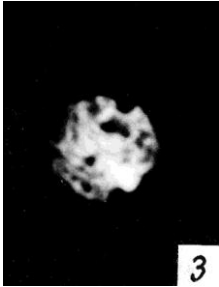
В отличие от представителей класса млекопитающих, у представителей классов птиц, пресмыкающихся, земноводных, рыб, моллюсков и насекомых в результате сперматогенеза и спермиогенеза в норме из ядра сперматоцита I-ого порядка (содержащего 4сДНК) образуется только два сперматозоида. Остальная часть ДНК (50%), содержащаяся в ядре сперматоцита I-ого порядка, элиминируется на том или ином этапе.



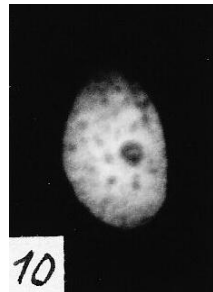
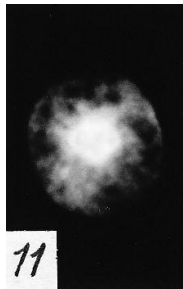
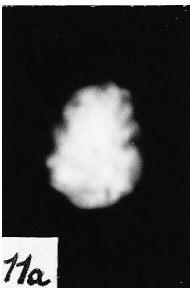
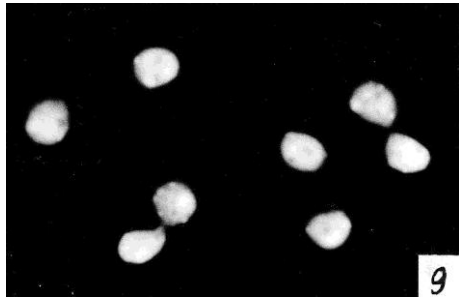
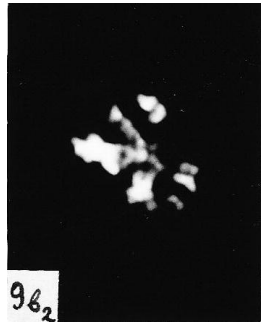
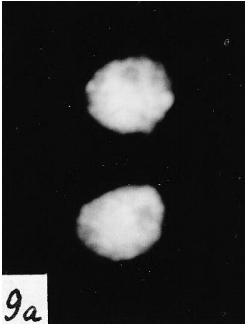
*Homo sapiens L. (norm.)*



*Homo sapiens (pathology)*



*Homo sapiens*



## 2. Класс – Птицы

### д). *Петух (Callus domesticus)*. $2n=78$ [12].

Материал для исследования был взят в конце января 1976 г. (в период активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза) от двух взрослых беспородных коричневых петухов, приобретённых в лаборатории иммуногенетики Института общей генетики АН СССР.

Смена ядерных форм в процессе сперматогенеза и спермиогенеза прослежена нами с образования ядер просперматоцитов I. У петуха нами были отмечены октоплоидные (фото 2) и 12-плоидные ядра просперматоцитов I, в результате митотического деления которых (2a, 2b) образуются два ( $3_{(2)}$ ) или три ( $3_{(1)}$ ) ядра сперматоцитов 1-ого порядка.

Образовавшиеся ядра сперматоцитов I-ого порядка (содержащие по 4сДНК) до цитокинеза ( $3a_1$ ) или после него ( $3a_2$ ) сильно уплотняются и превращаются в структуры произвольной угловатой формы ( $3a_1$ ,  $3a_2$ ).

В этот период в ядрах сперматоцитов I-ого порядка, по-видимому, происходит очень активное перераспределение ДНК, в результате которого из общей массы ДНК буквально «вымешиваются» 2 ядра сперматозоида (содержащие по 1сДНК) и 2 элиминируемых тела (также содержащих по 1сДНК), фото  $4_{(1)}$  и  $4_{(2)}$ .

Сформировавшиеся ядра сперматозоидов сначала закручены относительно друг друга ( $4_{(1)}$  и  $4_{(2)}$ , верхняя часть ядерных форм). Элиминируемые тела или сразу отделяются от ядер сперматозоидов ( $4_{(1)}$ , нижняя часть ядерной формы) или сначала имеют связь с задним концом ядер сперматозоидов ( $4_{(2)}$  и  $4_{(3)}$ , внизу справа). Все четыре ядерных образования продолжают оставаться в общей цитоплазме (фото  $4_{(4)}$  –  $4_{(7)}$ , по-видимому, до окончания формирования хвостов и акросом у сперматозоидов, после чего цитоплазма распадается, и сперматозоиды и

элиминируемые тела вместе с окружающими их участками цитоплазмы вытесняются в область семенного канальца (ближе к его просвету), которая заполнена гаплоидными лизирующими клетками (структурированные ядра на фото 9, 8). Здесь происходит полное освобождение зрелых сперматозоидов ( $7_{(1)}$ ) от лишней цитоплазмы и переваривание элиминируемых тел ( $8_{(1)}$  и  $8_{(2)}$ ). Часто можно видеть в различной степени удлинённые элиминируемые тела (которые точно пытаются превратиться в ядра сперматозоидов), которые очень скоро фрагментируются и лизируются ( $8_{(2)}$ ).

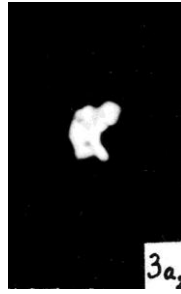
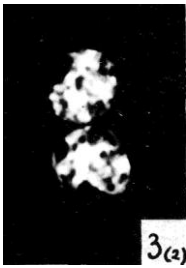
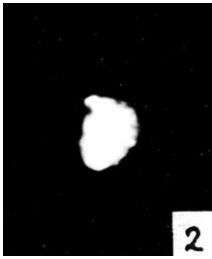
Гораздо реже на препаратах можно встретить случаи, когда в результате 1-ого деления мейоза образуются две телофазы I ( $4(8)$ ), из которых после цитокинеза формируется по одному ядру сперматозоида и одному элиминируемому телу ( $5_{(1)}$  и  $5_{(2)}$ ). Дальнейшие превращения происходят точно также как в клетках с четырьмя ядерными образованиями. На фото  $4_{(8)}$  в правой телофазе с одной стороны виден кончик образующегося ядра сперматозоида, а с другой стороны – тёмная вакуоль, которая выдаёт присутствие в этом месте элиминируемого тела.

На фото 9а представлены две метафазы лизирующих клеток (содержащие по 2сДНК), на фото 9, 8, наряду с гомогенными более яркими элиминируемыми телами, представлены интерфазные гаплоидные ядра лизирующих клеток с характерным распределением в них ДНК.

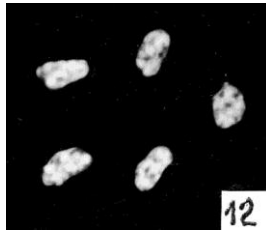
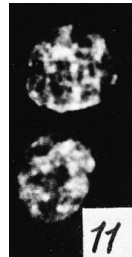
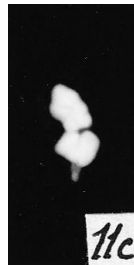
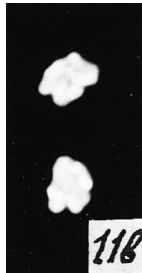
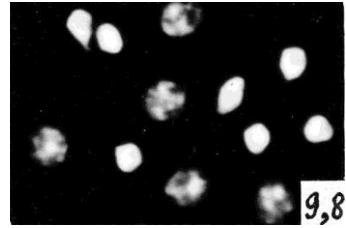
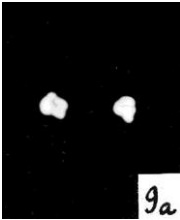
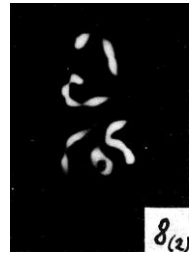
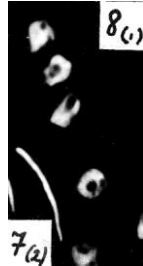
На фото 11а, 11б, 11с и 11 представлены соответственно: два профазных ядра, две метафазы (содержащие по 4сДНК), телофаза и два интерфазных диплоидных ядра интерстициальных клеток.

На фото 12 представлены диплоидные ядра эритроцитов (всегда присутствующих на препаратах), которые иной раз легко принять за ядерные формы, образующиеся в результате 1-ого деления мейоза (сравните фото  $4(8)$ ).

*Gallus domesticus L.*



*Gallus domesticus L.*



*е). Голубь (Columba livia). 2n = 80 [12].*

Материал для исследования был взят в начале ноября 1975 г. (в период активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза) от двух взрослых сизых голубей (дикого типа), приобретённых у любителя–голубятника.

Сперматогенез у голубя прослежен с образования последней генерации тетраплоидных сперматогоний. На фото 1 представлены три тесно расположенные ядра тетраплоидных сперматогоний (содержащие по 4сДНК). На фото 2 представлено 16-ти-плоидное ядро просперматоцита I. На фото 2а – деление 12-ти-плоидного ядра просперматоцита I, в результате которого будет образовано три ядра сперматоцитов I-ого порядка. На фото 2в и 2с – стадии деления октоплоидного ядра просперматоцита I. На фото 2с видно, что одно из образующихся в результате деления ядер раньше другого приобретает морфологию, характерную для ядра сперматоцита I-ого порядка. Такое явление нами было отмечено и у петуха, и, по-видимому, характерно для птиц.

Вновь образовавшиеся ядра сперматоцитов I-ого порядка (на фото 3<sub>(1)</sub> представлены два ядра в общей цитоплазме) содержат по 4сДНК. На фото 3<sub>(2)</sub> представлено одно такое же ядро, но сильно распластанное на предметном стекле; в нём, при микроскопировании, было хорошо видно хромомерное строение хромосом.

В процессе подготовки к мейотическому делению хромосомы (биваленты?, униваленты?) в ядрах сперматоцитов I-ого порядка укорачиваются и утолщаются (на фото 3а<sub>1</sub> представлена слегка распластанная ядерная форма, на фото 3а<sub>2</sub>, и 3а<sub>3</sub> – более интактные по морфологии). Затем в ядерных формах происходит перераспределение ДНП, по окончании которого от общей массы отбрасывается значительная часть ДНК (до 30–40%). На фотографиях 4<sub>(1)</sub> – 4<sub>(7)</sub> представлены лежащие в общей цитоплазме крупные



ядерные структуры (из которых впоследствии будут образованы два ядра зрелых сперматозоидов) и мелкие структуры, которые будут постепенно переварены внутри клетки (фото  $b_{(1)} - b_{(6)}$ ).

В процессе формирования – два ядра сперматозоидов постепенно удлиняются и освобождаются от лишней ДНК ( $b_{(1)} - b_{(6)}$ ) до тех пор, пока содержание ДНК в них не достигнет величины 1с. Сформировавшиеся зрелые сперматозоиды (содержащие по 1сДНК) освобождаются от окружающей цитоплазмы ( $7_{(1)}$ ).

В некоторых случаях из отброшенной части ДНК в клетке образуется нежно структурированное ядро ( $b_{(4)}$ ), которое затем постепенно переваривается и исчезает.

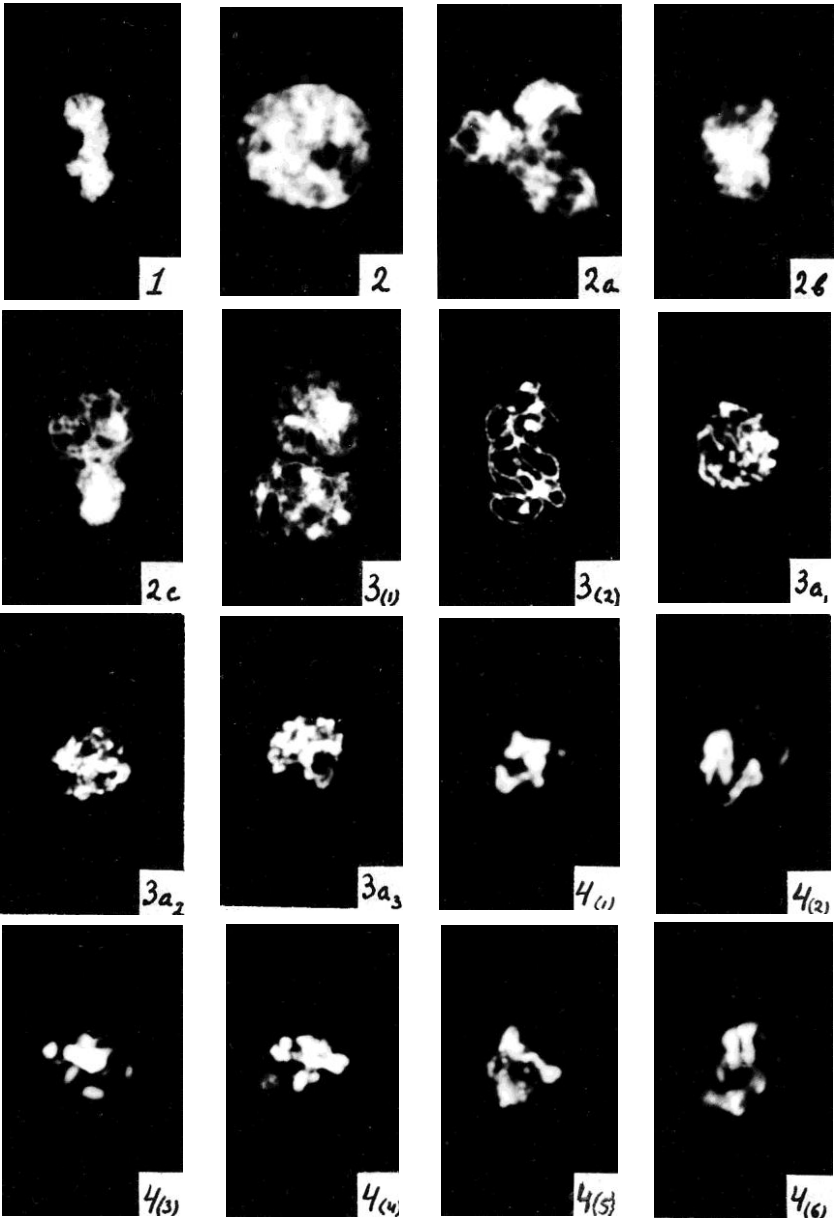
На фото 8 представлена картина полного распада ядра сперматоцита I-ого порядка на элиминируемые тела.

На фото ( $3_{(3)}, 3_{(4)}$  и  $3a_4$ ) представлены октоплоидные ядра сперматоцитов I-ого порядка, содержащие по 8сДНК, в результате мейотического деления которых образуются или четыре гаплоидных сперматозоида или один тетраплоидный (фото  $7_{(2)}$ ).

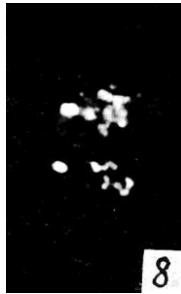
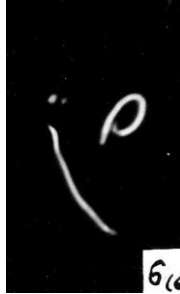
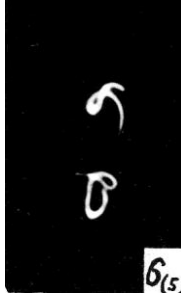
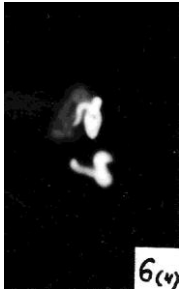
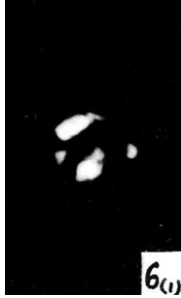
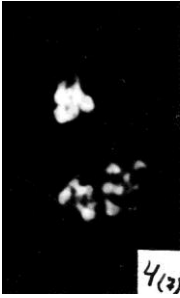
На фото  $4_{(8)}$  представлен случай, когда в результате 1-ого деления мейоза образуются две телофазы. Формирование ядра сперматозоида и элиминация половины ДНК, содержащейся в каждой телофазе, происходят в этом случае после цитокинеза ( $b_{(7)}, b_{(8)}$ ).

На фото 9а представлена метафаза гаплоидных лизирующих клеток (содержащая 2сДНК), на фото 11а – метафаза интерстициальных клеток (содержащая 4сДНК), на фото 9, 11 представлены гаплоидные интерфазные ядра лизирующих клеток (с одним хромосомом) и диплоидные интерфазные ядра интерстициальных клеток (более крупные ядра со многими хромосомами).

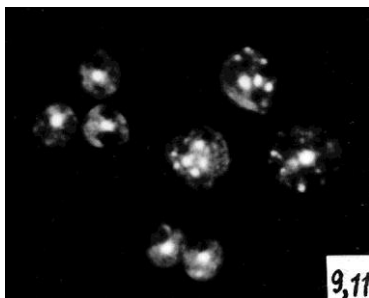
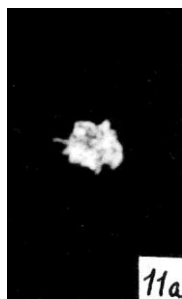
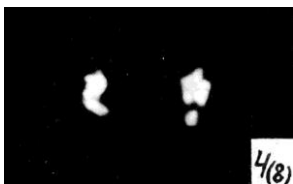
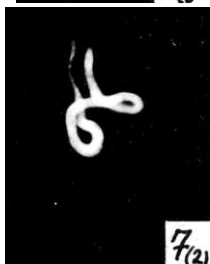
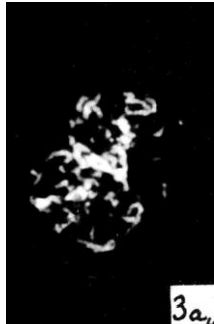
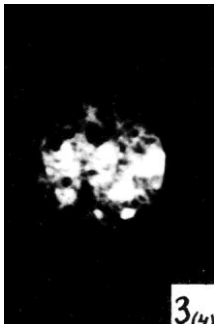
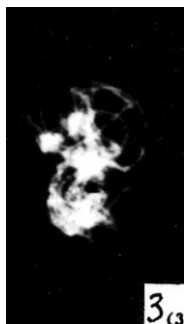
*Columba livia L.*



*Columba livia L.*



*Columba livia L.*



### 3. Класс – Пресмыкающиеся

*ж). Уж обыкновенный (Natrix natrix). 2n = 36 [76].*

Материал для исследования был взят в середине мая 1975 г. (в период активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза) от двух молодых животных (длиной 60 и 65 см), отловленных нами на берегах р. Десны (Московская область).

Сперматогенез у ужа прослежен нами с образования ядер просперматоцитов I. На фото 2 представлено октоплоидное ядро просперматоцита I, на фото 2а – начало деления 20-плоидного ядра просперматоцита I (в результате которого образуется пять ядер сперматоцитов I-ого порядка в общей цитоплазме), на фото 2б – деления 12-ти-плоидного ядра.

На фото 3<sub>(1)</sub> представлены два вновь образовавшихся (в результате деления октоплоидного ядра просперматоцита I дегенеративных ядра сперматоцитов I-ого порядка. Такие ядра, содержащие по 4сДНК и имеющие форму полусферы и характерное для интерфазного ядра распределение ДНК, в дальнейшем подвергаются автолизу и распадаются (образование abortивных ядер сперматоцитов I-ого порядка можно наблюдать и у представителей других классов животных).

На фото 3<sub>(2)</sub> представлены два вновь образовавшихся (в результате деления октоплоидного ядра просперматоцита I нормальных ядра сперматоцитов I-ого порядка на стадии, которую можно отнести к стадии пахитены.

На фото 3<sub>(3)</sub> такое же ядро в образовавшемся сперматоците I-ого порядка после цитокинеза.

В процессе подготовки к мейотическому делению – хромосомы в ядрах сперматоцитов I-ого порядка укорачиваются и в них становятся хорошо видимыми гомологичные хромосомы в бивалентах и расположенные

близко друг к другу униваленты мелких хромосом (3a, 3b<sub>1</sub>, 3b<sub>2</sub>, 3b<sub>3</sub>). На фото 3b<sub>2</sub> представлены мейотические хромосомы двух ядер сперматоцитов I-ого порядка, находящихся в общей цитоплазме.

Дальше мейотическое деление у ужа, как и у птиц, может проходить двумя путями.

В одном случае отдельные биваленты сближаются и образуют структуры произвольной угловатой формы (на фото 3c представлены две такие ядерные формы в общей цитоплазме), в которой, по-видимому, происходит перераспределение ДНП, по окончании которого ядерные формы распадаются на отдельные фрагменты (4<sub>(1)</sub>, 4<sub>(2)</sub>).

Из двух более крупных фрагментов формируются два ядра сперматозоидов, а остальная часть ДНП (50%) постепенно элиминируется в цитоплазме. На фото 6<sub>(1)</sub> представлены два почти полностью сформировавшихся ядра сперматозоидов (содержащие по 1сДНК) и очень небольшой остаток элиминируемой ДНК в общей цитоплазме. Полностью сформировавшиеся зрелые сперматозоиды освобождаются от окружающей цитоплазмы.

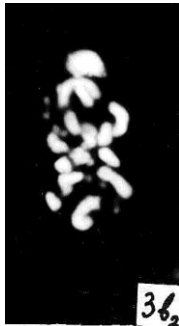
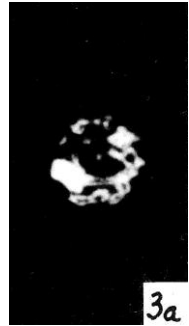
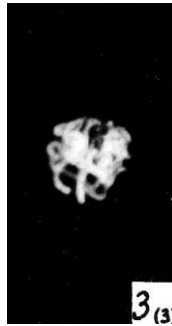
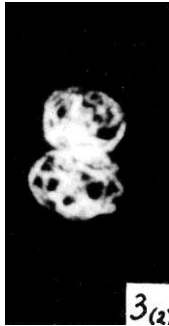
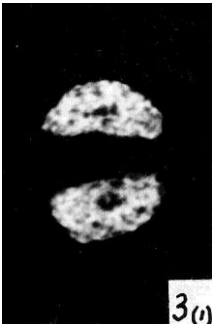
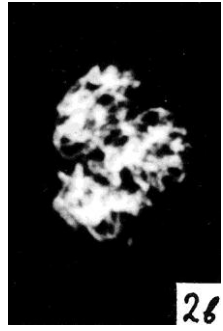
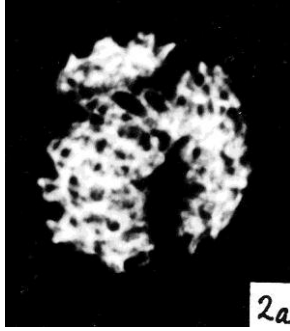
В другом случае (который для ужа, по-видимому, также характерен как и первый) биваленты образуют правильную метафазу (3d). Затем следуют анафаза, телофаза (4<sub>(3)</sub>, 4<sub>(4)</sub>) и цитокинез. Перераспределение ДНП в этом случае происходит в образующихся ядерных формах, которые можно отнести к ядерным формам сперматоцитов II-ого порядка. По окончании перераспределения ДНП ядерная форма (содержащая 2сДНК) распадается на фрагменты (5<sub>(1)</sub>, 5<sub>(2)</sub>). Из одного, более крупного, фрагмента формируется ядро сперматозоида, а остальная часть ДНК (50%) постепенно элиминируется (6<sub>(2)</sub> и 6<sub>(3)</sub>).

На фото 7 представлено ядро зрелого сперматозоида ужа.

На фото 9S, представлены интерфазные и находящиеся в S периоде ядра гаплоидных лизирующих

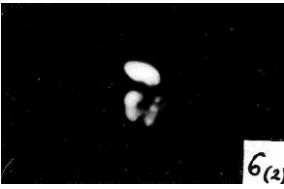
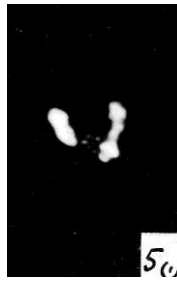
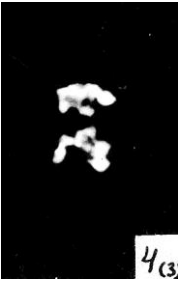
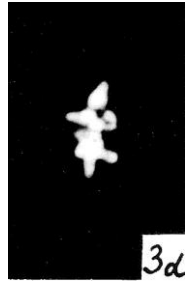
клеток (на этой же фотографии в центре – распавшаяся на фрагменты ядерная форма сперматоцита II-ого порядка ( $5_{(3)}$ ). На фото 9a<sub>1</sub>, 9b – делящиеся ядра гаплоидных лизирующих клеток. На фото 9 – интерфазные ядра гаплоидных лизирующих клеток (на этой же фотографии распавшаяся на фрагменты ядерная форма сперматоцита II-ого порядка ( $5_{(4)}$ ). На фото 11a, 11b и 11 соответственно: два профазных ядра (содержащие по 4сДНК), три метафазы и два интерфазных ядра диплоидных интерстициальных клеток. На фото 9a<sub>2</sub>, 9c – профаза (2сДНК) и телофаза деления ядер гаплоидных лизирующих клеток. На фото 12 – ядра эритроцитов.

*Natrix natrix L.*

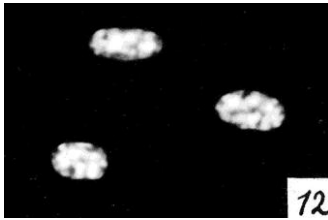
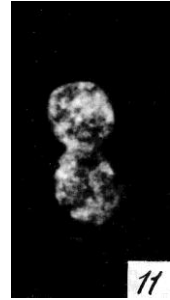
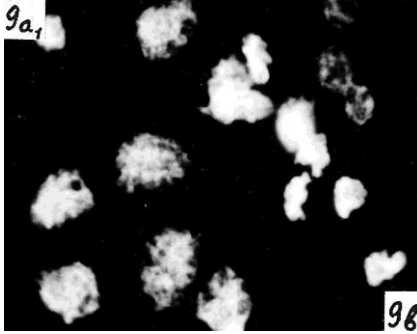
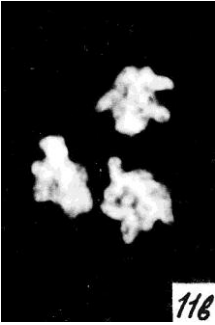
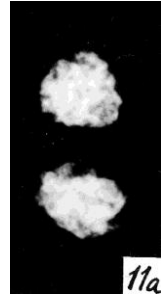
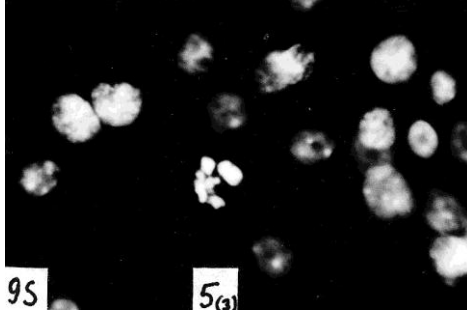
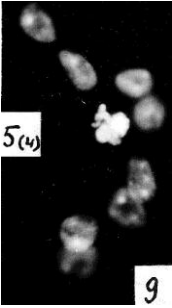




*Natrix natrix L.*



*Natrix natrix L.*



з). *Черепаха стенная среднеазиатская*  
(*Testudo horsfieldi*).  $2n = ?$

Материал для исследования был взят в начале мая 1975 г. (в период спада сперматогенеза и спермиогенеза; по-видимому, период активизации этих процессов приходится на март-апрель) от двух животных, приобретённых в зоомагазине.

Сперматогенез прослежен с образования ядер сперматоцитов I-ого порядка. На фото 3 представлены три вновь образовавшихся ядра сперматоцитов I-ого порядка (содержащих по 4сДНК) в общей цитоплазме.

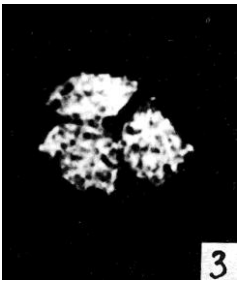
В процессе подготовки к мейотическому делению хромосомы в ядре сперматоцита I-ого порядка сначала сливаются (3a<sub>1</sub>), затем в ядре происходит перераспределение ДНП (3b<sub>1</sub>) и распад содержимого ядра на тонкие нити ДНК (которые затем элиминируются в цитоплазме) и два ядра сперматозоида (4<sub>(1)</sub>). На фото 7 представлены два ядра зрелых сперматозоидов, освободившихся от цитоплазмы.

На фото 4<sub>(2)</sub> и 4<sub>(3)</sub> представлен результат I-ого (и последнего) деления мейоза октоплоидных ядер сперматоцитов I-ого порядка, содержащих по 8сДНК (в результате содержимое каждого ядра распалось на четыре гаплоидных ядра сперматозоидов и элиминируемые тела).

У черепахи (как и у ужа) распад ДНП на ядро сперматозоида и элиминируемые тела может происходить и во 2-ом делении мейоза. В этом случае хромосомы в ядрах сперматоцитов I-ого порядка образуют у черепахи своеобразные метафазные структуры (3a<sub>2</sub>), затем следует анафаза (3b<sub>2</sub>), телофаза и цитокинез. На фото 5 представлен распад телофазы I на ядро сперматозоида и элиминируемые тела. На фото 6a и 6b представлены различные стадии элиминации ДНК во 2-ом делении мейоза.

На фото 11S, 11a и 11 представлены соответственно: ядро интерстициальной клетки в S периоде, профазное ядро интерстициальной клетки (содержащее 4сДНК) и интерфазные диплоидные ядра интерстициальных клеток.

*Testudo horsfieldi* Gray



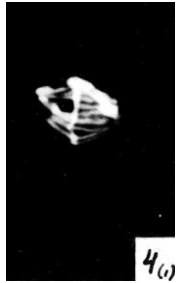
3



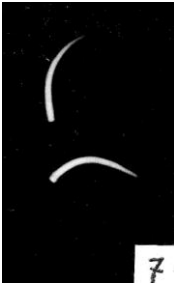
3a<sub>1</sub>



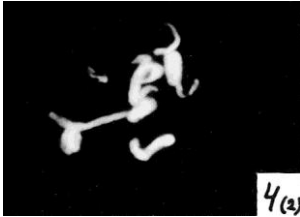
3b<sub>1</sub>



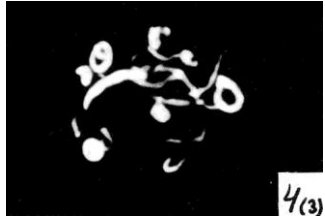
4(1)



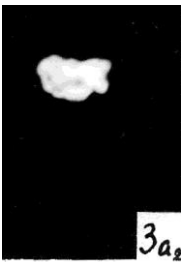
7



4(2)



4(3)



3a<sub>2</sub>



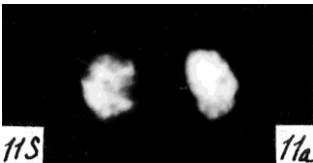
3b<sub>2</sub>



5

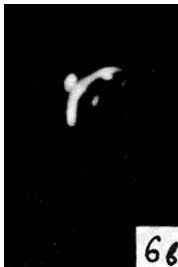


6a

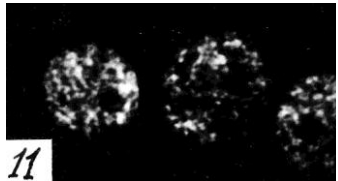


11S

11a



6b



11

#### 4. Класс – Земноводные

##### *и). Лягушка травяная (Rana temporaria). $2n = 26$ [12].*

Материал для исследования был взят в конце апреля, начале мая 1972 и 1974 гг. (в периоды активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза) от животных, отловленных нами в лесах по берегам р. Десны (Московская область).

Смена ядерных форм в процессе сперматогенеза у травяной лягушки прослежена с образования последней генерации тетраплоидных сперматогоний. На фото 1 представлена фигура деления (содержащая 8сДНК) последней генерации тетраплоидных сперматогоний.

По мере размножения часть тетраплоидных сперматогоний отделяется от общей массы и образует клетки с округлыми ядрами со слабо выраженными ядрышками. Ядра этих клеток вступают в S период, по окончании которого образуются просперматоциты I. У травяной лягушки нами отмечены октоплоидные ядра просперматоцитов I (фото 2). В результате деления октоплоидных ядер просперматоцитов 1 (2a и 2b) образуются ядра сперматоцитов I-ого порядка (содержащие по 4сДНК), лежащие сначала в общей цитоплазме ( $3_{(1)}$ ). Затем следует цитокинез и образуются сперматоциты I-ого порядка ( $3_{(2)}$ ).

В процессе подготовки к мейотическому делению хромосомы в ядрах сперматоцитов I-ого порядка сильно укорачиваются (3a) и образуют каплевидные мейотические хромосомы (3b). Конъюгации гомологичных хромосом у травяной лягушки, по-видимому, нет. Затем хромосомы в ядрах сближаются и образуют компактные ядерные формы. В анафазе 1-ого деления мейоза отдельные хромосомы становятся хорошо видны (3c).

В телофазных группах 1-ого деления мейоза ( $4_{(1)}$ ), по-видимому, происходит перераспределение ядерного

вещества, по окончании которого ДНП в телофазах распадается на отдельные фрагменты ( $5_{(1)}$ ,  $5_{(2)}$  и  $5_{(3)}$ ). Это совпадает по времени с завершением цитокинеза.

Некоторое представление о том, как выглядят половые клетки у травяной лягушки во время мейоза, дают микрофотографии фиксированных клеток в положительном фазовом контрасте, при фотографировании окрашенных на ДНК незаключенных сухих препаратов (объектив  $40\times$ , ап. 0,6; окуляр  $3\times$ , гомаль). Так, на фото  $4_{(1)}$  (фазовый контраст) представлены клетки, образовавшиеся в результате цитокинеза после 1-ого деления мейоза, которые ещё связаны цитоплазматическим мостиком.

В образовавшихся в результате 1-ого деления мейоза клетках, имеющих веретенообразную форму ( $4_{(2)}$ , фазовый контраст), из более крупного фрагмента ДНП формируется ядро сперматозоида (которое вначале уложено вчетверо по длине), а остальная часть ДНК (50%) в виде капель отходит к одному из концов веретенообразной клетки и вместе с небольшими участками окружающей цитоплазмы отшнуровывается от клетки в межклеточную среду (фото  $6_{(1)}$ ,  $6_{(2)}$ ,  $6_{(3)}$  и  $6_{(4)}$ ).

На фото  $4_{(2)}$  представлен результат 1-ого деления мейоза (без цитокинеза) с последующим распадом телофазных групп на фрагменты. В этом случае из ядерного материала сперматоцита I-ого порядка в клетке формируются два гаплоидных ядра сперматозоидов, а элиминируемые фрагменты ДНП (50%) в виде капель, окружённых тонким слоем цитоплазмы, отшнуровываются от тела клетки (подобная более крупная клетка представлена на фото  $4_{(3)}$ , фазовый контраст).

На фото  $6_{(5)}$  представлены (в двух рядом лежащих клетках) ядра сперматозоидов в период их разворачивания (в нижней клетке виден сохранившийся в цитоплазме фрагмент ДНК). На фото  $7_{(2)}$  (фазовый контраст) представлена сильно удлинившаяся клетка, освобождённая

от элиминируемых фрагментов ДНП, в которой начинается формирование хвоста у сперматозоида.

По завершении формирования сперматозоиды освобождаются от остатков окружающей цитоплазмы. На фото 7<sub>(1)</sub> представлены два ядра зрелых сперматозоидов (содержащих по 1сДНК).

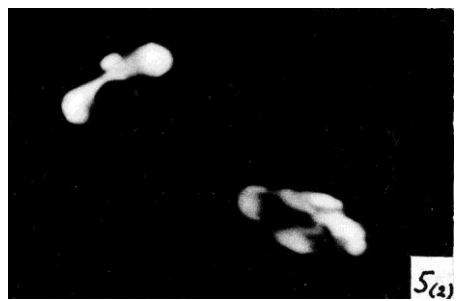
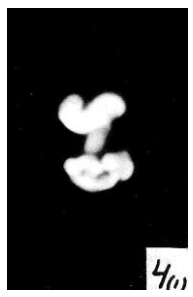
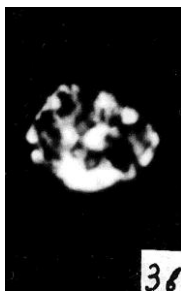
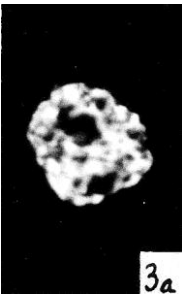
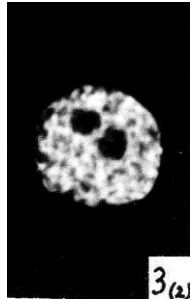
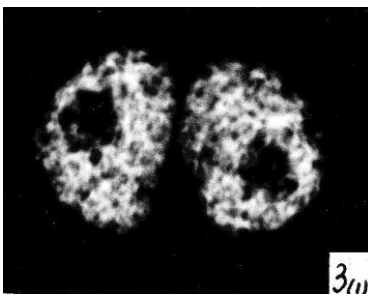
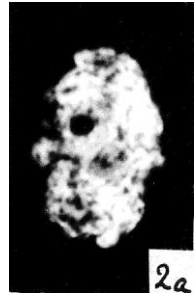
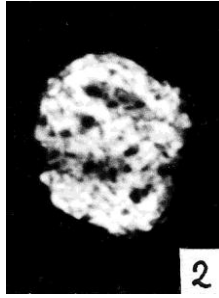
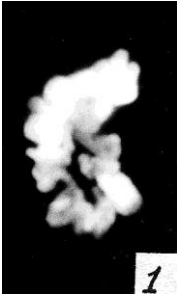
Таким образом, элиминация половины ДНК, первоначально содержащейся в ядре сперматоцита I-ого порядка, у травяной лягушки осуществляется путём выброса из клеток (образовавшихся в результате 1-ого деления мейоза) фрагментов ДНП, окружённых тонким слоем цитоплазмы. Затем эти фрагменты растворяются, по-видимому, под воздействием лизирующих клеток.

На фото 9S, 9a и 9 представлены соответственно: ядро лизирующей клетки в S периоде (~ 1,5сДНК), профазные (2сДНК) и интерфазные (1сДНК) гаплоидные ядра лизирующих клеток. Наблюдение живых клеток в фазовом контрасте показали, что лизирующие клетки, у изученных нами представителей земноводных, по-видимому (идентификация живых клеток крайне затруднена), имеют по одному очень тонкому и длинному подвижному жгутику.

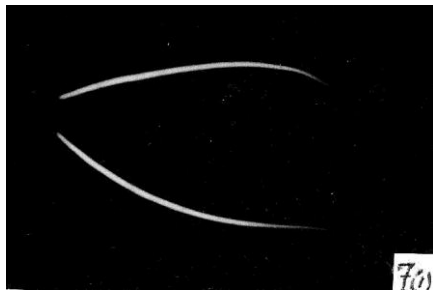
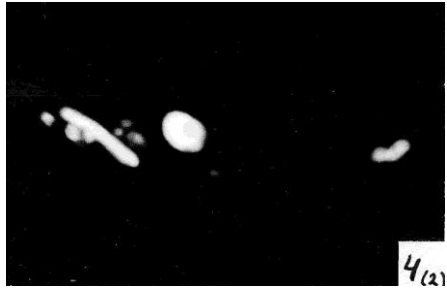
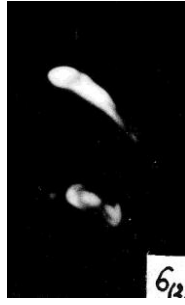
На фото 11a, 11b, 11c, 11d и 11 представлены соответственно: два профазных ядра (по 4сДНК), метафаза, анафаза, телофаза и интерфазные диплоидные ядра интерстициальных клеток.



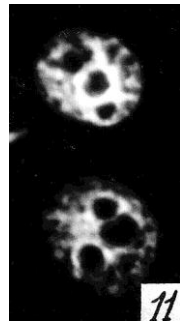
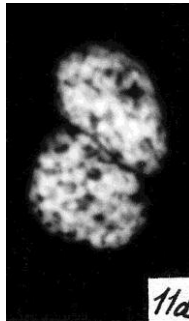
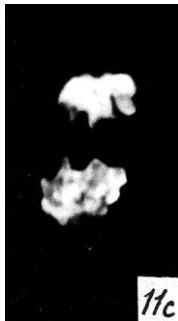
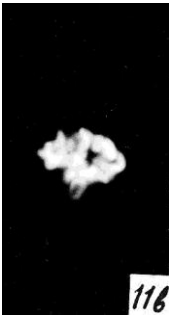
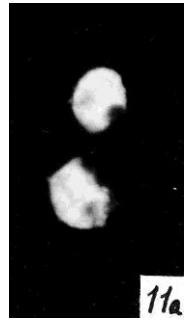
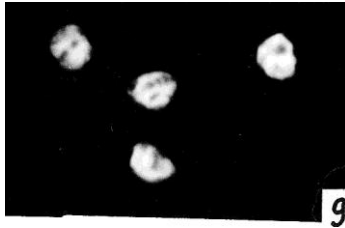
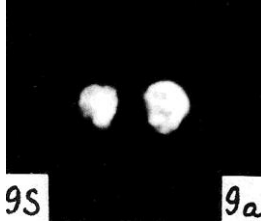
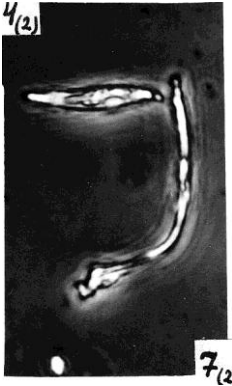
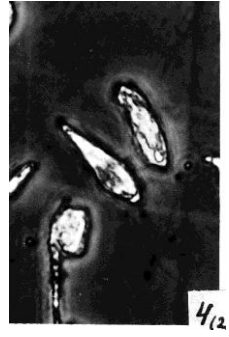
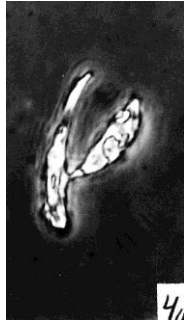
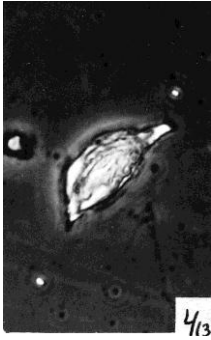
*Rana temporaria* L.



*Rana temporaria* L.



*Rana temporaria* L.



*к). Лягушка озёрная (Rana ridibunda). 2n = 26. [12].*

Материал для исследования был взят в конце мая, начале июня 1974 и 1976 гг. (период наиболее активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза, по-видимому, приходится на начало мая) от животных, отловленных на берегах р. Десны (Московская область).

Смена ядерных форм в процессе сперматогенеза прослежена с образования октоплоидных ядер просперматоцитов I (на фото 2 в ядре октоплоидного просперматоцита I видны тетрады гомологичных хромосом, каждая из которых уже состоит из 2-х хроматид). В результате деления ядер просперматоцитов I и цитокинеза образуются сперматоциты I-ого порядка, содержащие по 4сДНК.

В процессе подготовки к мейотическому делению хромосомы (биваленты) в ядрах сперматоцитов I-ого порядка (3) укорачиваются и утолщаются (3а). Затем следуют анафаза (3b, 3с и 3d), телофаза (4<sub>(1)</sub>) и цитокинез.

В ядрах образовавшихся сперматоцитов II-ого порядка (4<sub>(1)</sub>) происходит перераспределение ДНП (4<sub>(2)</sub>), по окончании которого содержимое ядерной формы, как и у травяной лягушки, распадается на фрагменты (5). Из самого крупного фрагмента ДНП формируется ядро сперматозоида (6а, 6b и 6с), а остальная часть ДНК (50%) элиминируется. В отличие от того, как это происходит у травяной лягушки, – элиминируемые фрагменты ДНП не выбрасываются постепенно из клетки, а растворяются в цитоплазме.

По завершении формирования зрелого сперматозоида цитоплазма вместе с остатками элиминируемых фрагментов отбрасывается. На фото 7<sub>(1)</sub> и 7<sub>(3)</sub> представлены по два гаплоидных ядра зрелых сперматозоидов, на фото 7<sub>(2)</sub> – одно ядро гаплоидного и два ядра (расположенных на препарате рядом) диплоидных сперматозоидов

(содержащих по 2сДНК), которые образуются при распаде на фрагменты ядерного вещества сперматоцита I-ого порядка (при этом половина ДНК также элиминируется). На фото 8 представлен случай полного распада содержимого ядра сперматоцита I-ого порядка на элиминируемые тела.

На фото 9а, 9б и 9 представлены соответственно: четыре профазных ядра (содержащих по 2сДНК) гаплоидных лизирующих клеток, поздняя анафаза митотического деления лизирующих клеток и два гаплоидных ядра (содержащих по 1сДНК) лизирующих клеток (эти ядра имеют характерную червеобразную форму). Следует заметить, что – поскольку лизирующие клетки у земноводных, по-видимому, снабжены подвижными жгутиками, то они могут изгибаться. При этом червеобразные ядра в этих клетках у озёрной лягушки также изгибаются (см. правое ядро лизирующей клетки на фото 9).

На фото 11а представлена метафаза (сфотографирован участок поперечного среза семенного канальца лягушки) интерстициальной клетки, на фото 11 – интерфазные диплоидные ядра интерстициальных клеток (содержащие по 2сДНК). Последние без цитофолуориметрического контроля легко принять на препарате за ядра сперматоцитов I-ого порядка, так как интенсивность люминесценции внешне сходных ядерных форм (различающихся по интенсивности люминесценции не больше чем в 2 раза) визуально оценить невозможно, особенно при высоких яркостях.

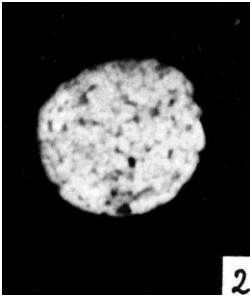
Поскольку об относительном содержании ДНК в ядрах ооцитов животных в настоящее время сведений очень мало, представляло интерес, в связи с изучением сперматогенеза и спермиогенеза у животных, получить хотя бы приблизительное представление о морфологии

распределения и относительном содержании ДНК в ядрах ооцитов некоторых животных.

С этой целью из молодых ооцитов озёрной лягушки под бинокулярной лупой на обезжиренных предметных стёклах остро отточенными препаровальными иглами были выделены ядра. Ядра выделяли в 0,25 М растворе сахарозы, содержащем 0,0012 М  $\text{CaCl}_2$  [16] и, не допуская подсушивания, фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты и окрашивали (вместе с препаратами сперматозоидов) по люминесцентной модификации метода Фельгена, как это описано выше.

Измерение относительного содержания ДНК в изолированных ядрах ооцитов показало, что содержание ДНК в этих ядрах равно 11с (n=6; к.в.=4,4%). Цитофлуориметрию ядер проводили с применением объектива 40× ап. 0,65; планахромат. Такое высокое относительное содержание ДНК в ядрах ооцитов озёрной лягушки, по-видимому, объясняется высоким содержанием равномерно рассеянной в кариолимфе этих ядер внехромосомной ДНК. Такое предположение подтверждает то, что на препаратах было также найдено два интактных ядра, в которых, в силу каких-то причин, хромосомы были собраны в компактные образования на фоне диффузно окрашенных относительно очень крупных ядер, благодаря чему стало возможным при измерениях относительного содержания ДНК в хромосомном наборе ооцитов исключить влияние фона кариолимфы. Измерения, проведённые на этих двух ядрах показали, что содержание ДНК в хромосомном наборе ооцитов озёрной лягушки равно 4с. Такие исследования необходимо значительно расширить. На стр. 170 на фото 7 представлен участок интактного ядра ооцита озёрной лягушки (объектив 100×, ап. 1,32, апохромат; окуляр 3× гомаль, конечное увеличение 1400).

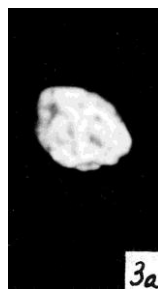
*Rana ridibunda* Pall



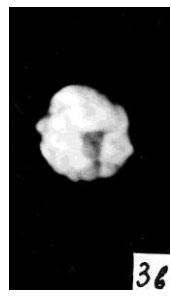
2



3



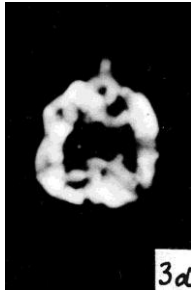
3a



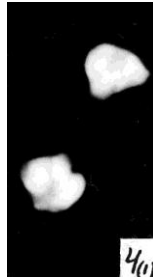
3b



3c



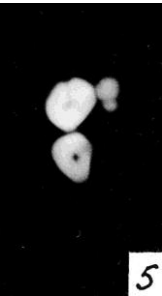
3d



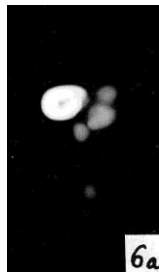
4(a)



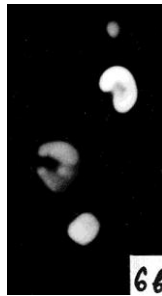
4(b)



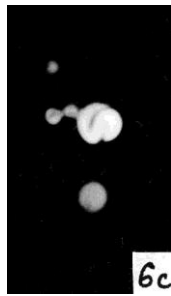
5



6a

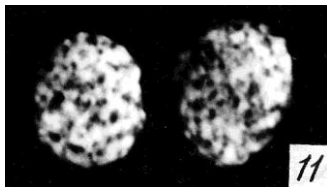
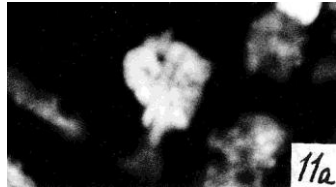
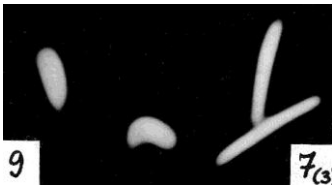
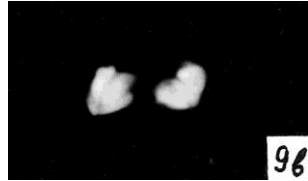
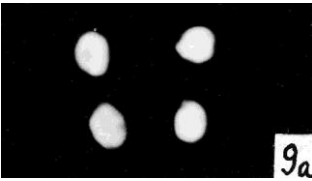


6b



6c

*Rana ridibunda* Pall





л). *Жаба зелёная (Bufo viridis). 2n = 22 [12].*

Материал для исследования был взят в конце мая 1975 г. (в период активного протекания спермиогенеза, период размножения сперматогоний, по-видимому, приходится на начало мая) от животных, отловленных в г. Москве.

На фото 1 представлена фигура деления (содержащая 8сДНК), по-видимому, последней генерации тетраплоидных сперматогоний.

Смена ядерных форм прослежена нами с деления октоплоидных ядер просперматоцитов I (содержащих 8сДНК), в результате которого после цитокинеза образуются два сперматоцита I-ого порядка.

Мейотическое деление у жабы, по нашим наблюдениям, преимущественно одноэтапное. Хромосомы в ядре вновь образовавшегося сперматоцита I-ого порядка (3) сначала образуют сгущения (3а), которые затем сливаются, в результате чего образуется ядерная форма с гомогенно распределённой в ней ДНК. В этот период в ядре, по-видимому, происходит перераспределение ДНП, по окончании которого в нём становятся видны в большей или меньшей степени сформировавшиеся два ядра будущих сперматозоидов. На фото 4<sub>(1)</sub>–4<sub>(4)</sub> представлены интактные ядерные формы (содержащие по 4сДНК), в которых видны – или скрученные относительно друг друга, или лежащие параллельно удлинённые тела, из которых формируются ядра будущих сперматозоидов.

На фото 4<sub>(5)</sub> представлена более поздняя стадия первого (и последнего) деления мейоза: два лежащих рядом параллельно друг другу изогнутых ядра сперматозоидов, которые уже полностью обособлены от элиминируемой части ДНК. На фото 4<sub>(6)</sub> представлена такая же стадия 1-ого деления ядерной формы, в которой, благодаря тому, что она сильно распластана на предметном стекле, видны два ядра сперматозоидов (одно из которых полностью

освобождено от элиминируемой ДНК, справа) и элиминируемая часть ДНК (около 50%). По мере формирования ядер зрелых сперматозоидов от них отделяются фрагменты элиминируемой ДНК (как бы «слушиваются» слоями). Элиминируемые фрагменты затем вместе с участками цитоплазмы отрываются от клетки, оттесняются ближе к просвету семенного канальца и перевариваются лизирующими клетками.

На фото 6 представлены два скрученных ядра сперматозоидов почти полностью «очищенных» от элиминируемой ДНК (в клетке ещё присутствует около 15% ДНК, подлежащей элиминированию). На фото 7 представлены ядра зрелых сперматозоидов, содержащих по 1сДНК.

Гораздо реже у жабы мы наблюдали двухэтапное мейотическое деление, в процессе которого образуются сперматоциты II-ого порядка. При этом сначала происходит 1-ое деление мейоза (на фото 3b представлена метафаза 1-ого деления, в которой хорошо видны отдельные биваленты), в результате которого вначале образуются близко расположенные ядра сперматоцитов II-ого порядка (4<sub>(7)</sub>) с гомогенно распределённой в них ДНК. По окончании цитокинеза (или до него) ядра сперматоцитов II-ого порядка распадаются на фрагменты, в одном из которых формируется ядро сперматозоида (нижний фрагмент на фото 5), а остальные отбрасываются с цитоплазмой\*.

Таким образом, в мейозе у жабы образуются или два ядра сперматозоидов в ядре сперматоцита I-ого порядка, или по одному ядру сперматозоидов в двух ядрах сперматоцитов II-ого порядка, а остальная часть ДНП (50%) элиминируется.

\*) По такой же схеме, по-видимому, протекает спермиогенез у саламандр, описание 1-ого деления мейоза у которых мы находим в работе Кезера [22]. Нужно

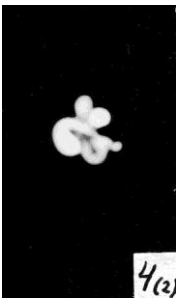
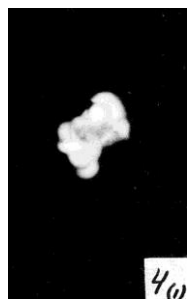
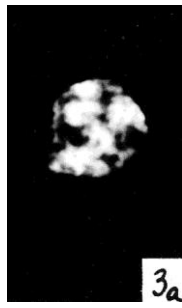
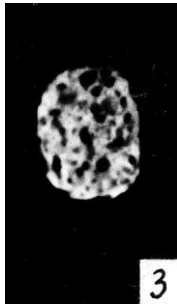
заметить, что в упомянутой работе имеются и явные ошибки. Так, картины деления ядер клеток, не имеющих прямого отношения к половому пути, автор представляет как картины II-ого деления мейоза. Например, хромосомные наборы в анафазе митотического деления, скорее всего, гаплоидных лизирующих клеток представлены как хромосомные наборы, из которых впоследствии образуются ядра сперматозоидов (см. рис. 71 в работе [22]). Основанием для такого заключения может, по-видимому, служить все вышеизложенное.

Как и у лягушек, у жабы нами были отмечены случаи образования диплоидных сперматозоидов из ядер сперматоцитов I-ого порядка и случаи полного распада ядерного вещества сперматоцитов I-ого порядка на элиминируемые тела.

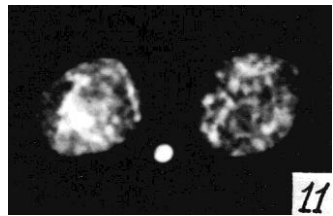
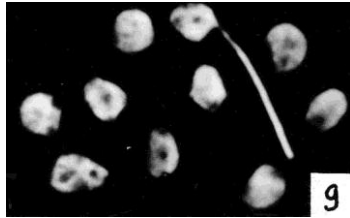
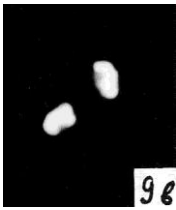
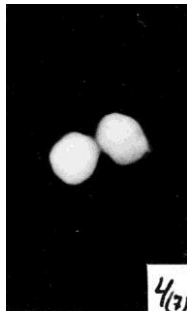
На фото 9а, 9б и 9 в представлены соответственно: метафаза (содержащая 2сДНК), поздняя телофаза и интерфазные гаплоидные ядра лизирующих клеток (молодых и разрушающихся старых).

На фото 11а, 11б, 11с и 11 в представлены соответственно: профаза (хромосомы в которой образуют характерную фигуру «букета», 4сДНК), анафаза, ранняя телофаза и интерфазные диплоидные ядра интерстициальных клеток. На фото 11 (посередине) виден фрагмент элиминируемой ДНК, отброшенный с цитоплазмой из сперматоцитов.

*Bufo viridis* Laur



*Bufo viridis* Laur



## 5. Класс – рыбы

### *м). Вьюн (Misgurnus fossilis). 2n = ?*

Время года, к которому приурочено активное протекание сперматогенеза и спермиогенеза у вьюна в условиях Московской и Ленинградской областей, неизвестно.

Долгое время нам не удавалось получить препараты клеток из семенников вьюна на различных стадиях сперматогенеза (у лабораторных вьюнов, содержащихся без пищи в холодных помещениях, в семенниках не удаётся обнаружить ничего кроме эпителиальных и интерстициальных клеток, эритроцитов и зрелых сперматозоидов).

Поэтому было решено содержать вьюнов в аквариуме до тех пор, пока у них не начнётся сперматогенез. Поскольку вьюн в настоящее время является одним из самых популярных объектов в биологии развития, остановимся на этом подробнее.

Первые попытки содержания вьюнов в аквариуме при комнатной температуре окончились неудачей. Несмотря на то, что в аквариуме часто меняли воду (через два дня на третий, использовали отстоянную водопроводную воду) вьюны были вялые, отказывались от пищи (мелкий мотыль) и в конце концов погибали.

Положение совершенно изменилось, когда в аквариум со вьюнами (в аквариуме на 8–10 литров содержали 6 самцов) были помещены беззубки (5–7 крупных беззубок) вместе с речным илом и содержащимися в нём мелкими организмами (опыт был начат 4/V–1975 г.). Через несколько дней вьюны стали очень активны, играли друг с другом и активно поедали того же мотыля, от которого раньше отказывались.

Беззубки в таких условиях содержания обычно через 10–12 дней погибали, поэтому живых беззубок и речной ил в аквариуме сменяли каждую неделю (беззубок отлавливали в р. Десне (Московская область), там же брали речной ил, воду как и прежде сменяли через два дня на третий).

Было отмечено, что вьюны в аквариуме часто останавливаются около выводного сифона беззубок. Поэтому создалось впечатление, что в воде, выталкиваемой из выводного сифона беззубок, содержатся какие-то биологически активные вещества, которые благоприятно действуют на вьюнов. При таком содержании уже через месяц в семенниках у двух вьюнов мы смогли обнаружить клетки на различных стадиях сперматогенеза.

Опыт был закончен 30/VI–1975 г., то есть почти через 2 месяца, когда у всех четырёх оставшихся в аквариуме вьюнов было отмечено активное протекание процессов сперматогенеза и спермиогенеза.

Смена ядерных форм в процессе сперматогенеза у вьюна прослежена нами с образования проспериоцитов I. Были отмечены только октоплоидные ядра проспериоцитов I (содержащие 8сДНК, фото 2), в результате деления которых образуются ядра сперматоцитов I-ого порядка, лежащие сначала в общей цитоплазме (3). Затем следует цитокинез и образуются сперматоциты I-ого порядка, в ядрах которых отдельные хромосомы неразличимы.

Деление мейоза начинается с интенсивного перераспределения ДНП в ядрах (3а–3d), по окончании которого ядерная форма сперматоцита I-ого порядка распадается на несколько фрагментов ( $4_{(1)}-4_{(3)}$ ). Из двух наиболее крупных фрагментов затем образуются два ядра будущих сперматозоидов, а остальная часть ДНК (50%) постепенно переваривается в цитоплазме клетки ( $6_{(1)}$  и

6<sub>(2)</sub>). По окончании элиминации ДНК и формирования хвостов образуются зрелые сперматозоиды, ядра которых содержат по 1сДНК (см. 7 на различных фотоснимках).

Реже в результате 1-ого деления мейоза сначала образуются две ядерные структуры неопределённой формы, содержащие по 2сДНК (4<sub>(4)</sub>), которые после цитокинеза также распадаются на отдельные фрагменты (5<sub>(1)</sub> и 5<sub>(2)</sub>). В этом случае из материала каждой ядерной структуры, образовавшейся в результате 1-ого деления мейоза, формируется одно ядро будущего сперматозоида, а остальная часть ДНК (50%) постепенно переваривается в цитоплазме клетки (6<sub>(3)</sub> и 6<sub>(4)</sub>).

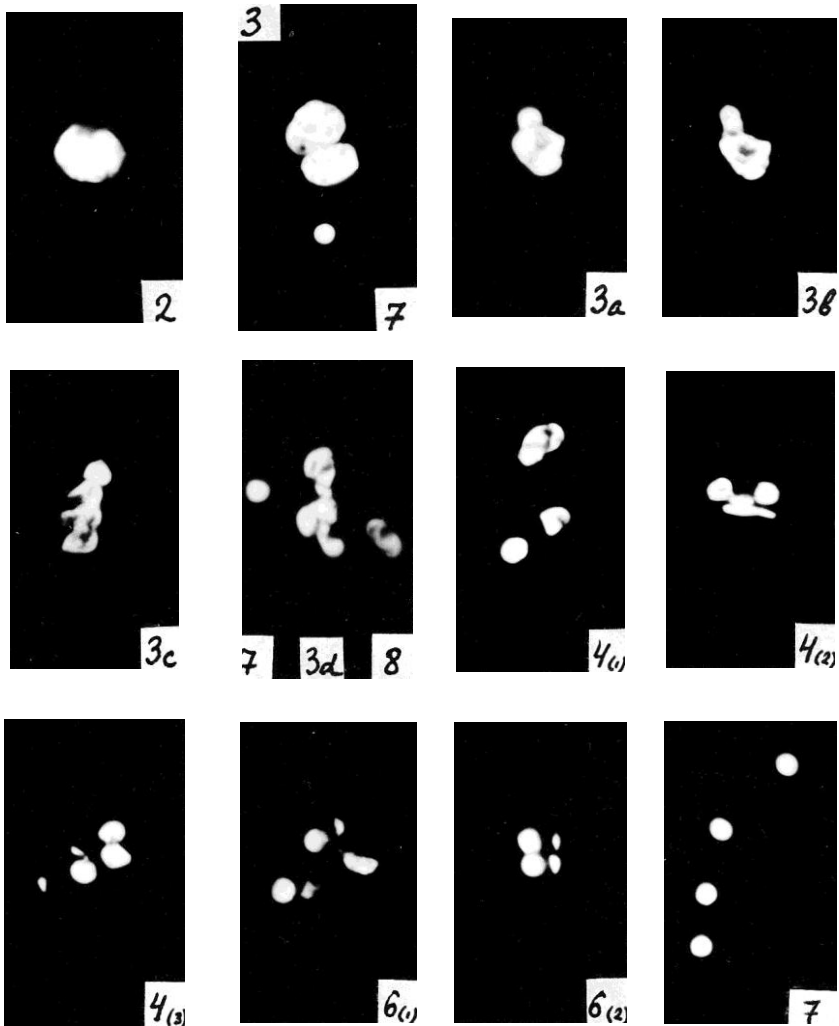
На фото 9 представлено ядро гаплоидной лизирующей клетки (содержащее 1сДНК), которое отличается от ядер зрелых сперматозоидов (на том же фотоснимке, вверху) тем, что оно более крупное и менее яркое.

На фото 11 представлено крупное структурированное интерфазное диплоидное ядро интерстициальной клетки, на фото 11а – метафаза деления интерстициальной клетки (4сДНК).

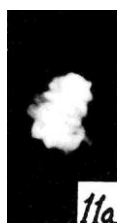
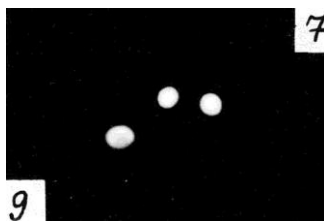
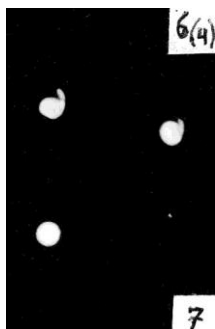
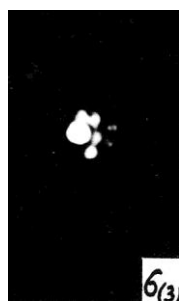
На фото 12 – диплоидные ядра эритроцитов, присутствие которых на препаратах обычно очень мешает наблюдениям.



*Misgurnus fossilis* L.



*Misgurnus fossilis* L.



### н). Сом (*Silurus glanis*). $2n = ?$

Материал для исследования был взят в начале июня 1975 г. (в период активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза) от двух взрослых сомов (весом по 1,5 кг) в очень жизнеспособном состоянии, приобретённых в магазине живой рыбы (место отлова неизвестно).

Смена ядерных форм в процессе сперматогенеза у сома прослежена с ядер просперматоцитов I. На препаратах были отмечены только октоплоидные ядра просперматоцитов I. В то же время на препаратах встречались клетки, содержащие по три или пять вновь образовавшихся ядер сперматоцитов I-ого порядка, что свидетельствовало об образовании этих ядер в результате деления 12-ти и 20-ти-плоидных ядер просперматоцитов I.

На фото 2а представлена фигура деления октоплоидного ядра просперматоцита I (содержащего 8сДНК), на фото 3 представлены три вновь образовавшихся ядра сперматоцитов I-ого порядка, содержащие по 4сДНК, в общей цитоплазме.

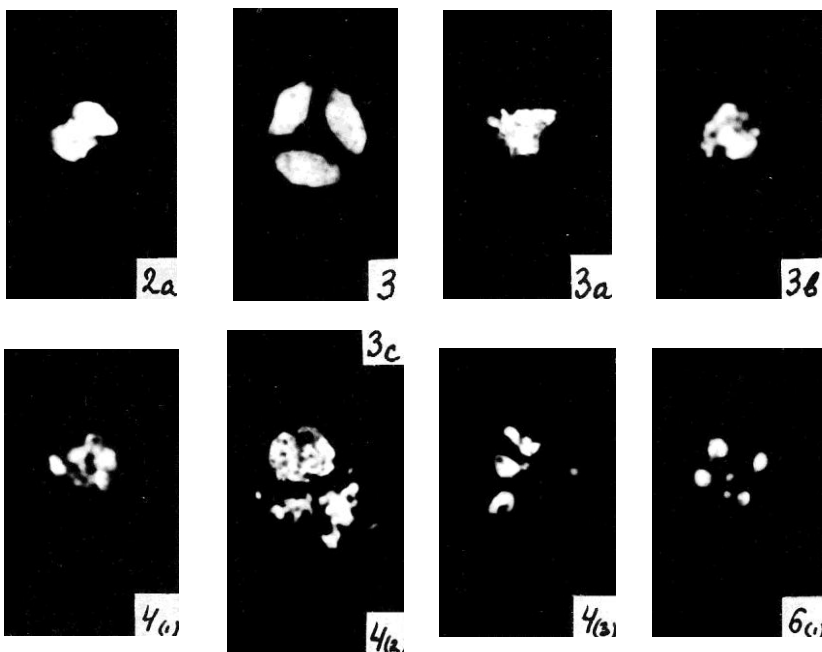
После цитокинеза (или до него, на фото 3с, 4<sub>(2)</sub>) представлены два ядра сперматоцитов I-ого порядка на разных стадиях деления мейоза, находящиеся в общей цитоплазме) в ядрах сперматоцитов I-ого порядка начинается перераспределение ДНП (3а, 3б, 3с), по окончании которого ядерная форма распадается (как и у вьюна) на несколько фрагментов (4<sub>(1)</sub>, 4<sub>(2)</sub>, 4<sub>(3)</sub>). Из двух наиболее крупных фрагментов затем формируются ядра будущих сперматозоидов, а остальная часть ДНК (50%) постепенно переваривается в цитоплазме клетки (6<sub>(1)</sub>, 6<sub>(2)</sub>, 6<sub>(3)</sub>). По окончании элиминации ДНК и формирования хвостов образуются зрелые сперматозоиды, содержащие по 1сДНК (7<sub>(1)</sub> и 7<sub>(2)</sub>).

Довольно часто у сома (подобно тому, как это мы видели у вьюна) в результате 1-ого деления мейоза (на

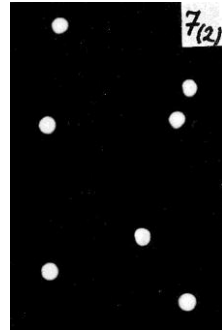
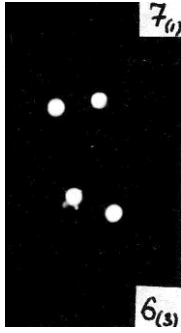
фото 3d и 3e представлены характерные и очень своеобразные метафаза и анафаза) сначала образуются две ядерные структуры, содержащие по 2сДНК (4<sub>(4)</sub>), которые после цитокинеза также распадаются на отдельные фрагменты (5). В этом случае в каждой клетке из наиболее крупного фрагмента ДНП формируется одно ядро будущего сперматозоида, а остальная часть ДНК также постепенно переваривается в цитоплазме.

На фото 9 представлены гаплоидные ядра лизирующих клеток, содержащие по 1сДНК, которые имеют характерную форму.

*Silurus glanis L.*



*Silurus glanis L.*



## ТИП – МОЛЛЮСКИ

### 6. Класс – Пластинчатожаберные моллюски

#### *о). Беззубка (Anodonta mutabilis). $2n = ?$*

Материал для исследования был взят в начале июня 1975 г. (в период активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза) от животных, отловленных в р. Десне (Московская область).

Смена ядерных форм в процессе сперматогенеза у беззубки прослежена с деления октоплоидных и 16-типлоидных ядер просперматоцитов I, в результате которого образуются ядра сперматоцитов I-ого порядка, содержащие по 4сДНК.

Клетки, образовавшиеся в результате последовательных делений просперматоцитов I и сперматоцитов I-ого порядка образуют в семенниках беззубки обособленные глобулы, которые распадаются по мере того, как из сперматоцитов II-ого порядка образуются зрелые сперматозоиды. На фотографиях во втором ряду и на второй фотографии (считая слева) в третьем ряду представлены клетки, относящиеся к отдельным (частично распавшимся при приготовлении препаратов) таким глобулам.

На фото 2a<sub>1</sub> представлено деление 16-типлоидного ядра просперматоцита I, в результате которого образуется четыре ядра сперматоцитов I-ого порядка, которые в результате 1-ого деления мейоза образуют глобулу из 8-ми клеток сперматоцитов II-ого порядка.

На фото 2a<sub>2</sub> представлено деление октоплоидного ядра просперматоцита I, в результате которого образуется два ядра сперматоцитов I-ого порядка, которые в результате 1-ого деления мейоза образуют глобулу из 4-х клеток сперматоцитов II-ого порядка.

На фото  $Z_{(1)}$ ,  $Z_{(2)}$  и  $Z_{(3)}$  представлены ядра вновь образовавшихся сперматоцитов I-ого порядка, в которых видны толстые хромосомы.

В процессе подготовки к 1-ому делению мейоза хромосомы в ядре сперматоцита I-ого порядка сливаются и образуют ядерную форму с гомогенно распределённой в ней ДНК. В этот период в ядре сперматоцита I-ого порядка, по-видимому, происходит интенсивное перераспределение ДНК. Затем следует 1-ое деление мейоза, которое внешне выглядит как простое перетягивание надвое ядерной формы (3а), в результате которого образуется два почти гомогенных ядра сперматоцитов II-ого порядка, содержащих по 2сДНК (фото  $4_{(1)}$ – $4_{(3)}$ ).

Спермиогенез у беззубок начинается с того, что в одном месте или нескольких местах на поверхности ядра сперматоцита II-ого порядка образуются сначала небольшие гомогенные шляпкоподобные выросты, один из которых увеличивается до тех пор, пока количество ДНК в нём не достигнет величины равной 1с (фото 4а–4е). Эти выросты представляют собой формирующиеся ядра будущих сперматозоидов. При этом по мере формирования ядер будущих сперматозоидов, гомогенная вначале ядерная форма сперматоцита II-ого порядка, из которой выщепляется ядро сперматозоида, приобретает характерную тонкую структуру (Сравните фото  $4_{(1)}$  и 4е). Если на ядре возникло вначале несколько выростов, то один из них в своём росте, как правило, обгоняет другие и, когда содержание ДНК в нём достигает величины равной 1с (фото 5), ядерная форма, на которой этот вырост образовался, начинает в клетке перевариваться. На фото 6а–6е представлены последовательные стадии элиминации половины количества ДНК, первоначально содержащейся в ядре сперматоцита II-ого порядка. При этом элиминируется, как мы видим, та часть ДНК, которая

содержится в нежно структурированной части ядерной формы и в мелких отставших в своём росте выростах.

По окончании элиминации ДНК начинается формирование хвостов и образуются зрелые сперматозоиды ( $7_{(1)}-7_{(4)}$ ).

На фото 3b, 3с и 4<sub>(4)</sub> представлены случаи формирования ядер сперматозоидов прямо из ядер сперматоцитов I-ого порядка, минуя стадию I-ого деления мейоза. На фото 3b в одном из ядер, (расположенном в правом нижнем углу) видно начало образования выроста будущего ядра сперматозоида (светлая шляпка), на фото 3с видно, как из ядра сперматоцита I-ого порядка на противоположных полюсах ядра формируются два ядра сперматозоидов. На фото 4<sub>(4)</sub> видно, что из ядра сперматоцита I-ого порядка уже сформировалось ядро диплоидного сперматозоида, содержащее 2сДНК, а элиминация остальной части ДНК уже зашла далеко.

На фото 7<sub>(3)</sub> наряду с гаплоидным представлено ядро (более крупное) зрелого диплоидного сперматозоида.

На фото 7<sub>(4)</sub> представлены лежащие на препарате рядом гаплоидное и тетраплоидное ядро зрелых сперматозоидов. Тетраплоидные сперматозоиды образуются из октоплоидных сперматоцитов I-ого порядка. На фото 8 представлено очень маленькое (содержащее около 0,1сДНК) ядро abortивного микросперматозоида, у которого мы обнаружили даже хвостик.

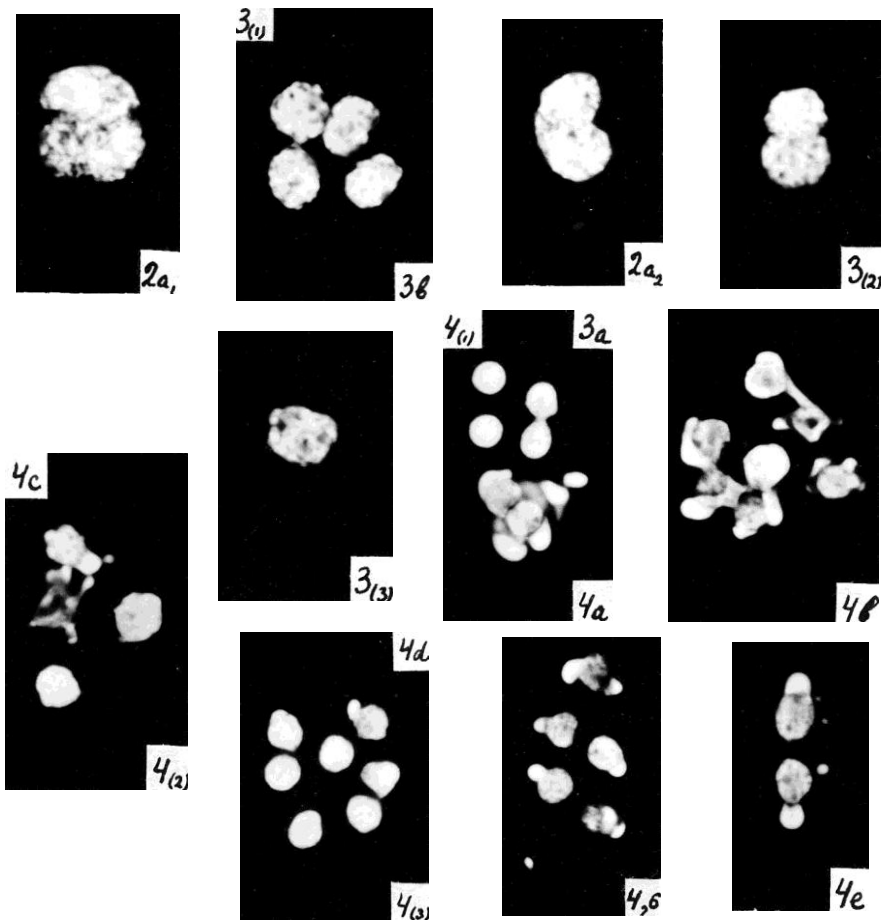
На фото 9 представлено профазное ядро (содержащее 2сДНК), телофаза и интерфазное ядро (круглое гомогенное ядро, содержащее 1сДНК) гаплоидных лизирующих клеток беззубки. На фото 11S, 11a и 11 представлены синтезирующее, профазное (содержащее 4сДНК) и интерфазные диплоидные ядра интерстициальных клеток.

Измерения относительного содержания ДНК в ядрах ооцитов беззубки (фото 6, стр. 170, объектив 100×, ап. 1,32, окуляр 3× гомаль, конечное увеличение 1400) показало,

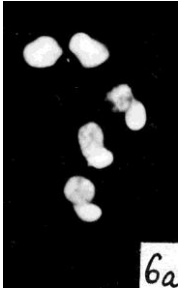


что содержание ДНК в них равно 4с. В отличие от ядер ооцитов озёрной лягушки (см. стр. 131) в ядрах ооцитов беззубки внехромосомной ДНК нет.

*Anodonta mutabilis*



*Anodonta mutabilis*



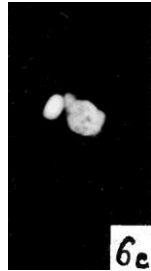
6a



5



6b



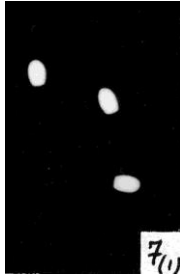
6c



6d



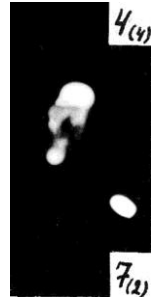
6e



7(1)

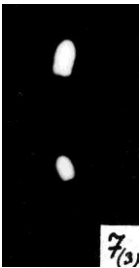


3c



4(4)

7(2)



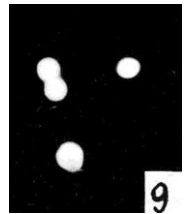
7(3)



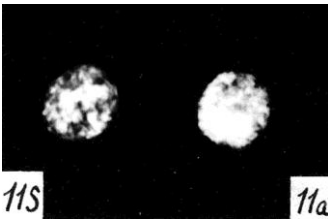
7(4)



8

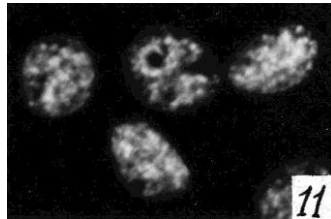


9



11s

11a



11

## ТИП – ЧЛЕНИСТОНОГИЕ

### 7. Класс – Насекомые

#### *n). Конёк бурый (Chorthippus apricarius). 2n = 22 [12].*

Материал для исследования был взят в августе 1972–75 гг. (в период наиболее активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза) от животных, отловленных в пределах г. Москвы.

Сперматогенез у конька прослежен нами с образования последней генерации тетраплоидных сперматогоний. На фото 1 представлены два вновь образовавшихся ядра последней генерации тетраплоидных сперматогоний (содержащие по 4сДНК). По мере размножения часть тетраплоидных сперматогоний отделяется от общей массы и образует клетки с круглыми ядрами. Ядра этих клеток вступают в S период, по окончании которого образуется следующая генерация клеток – просперматоциты I. На фото 2S<sub>1</sub> представлено ядро отделившегося тетраплоидного сперматогония, которое вступило в S период и содержит около 5сДНК, на фото 2S<sub>2</sub> также представлено ядро тетраплоидного сперматогония, превращающегося в ядро просперматоцита I, которое содержит около 6сДНК. На фото 2<sub>(1)</sub> и 2<sub>(2)</sub> представлены соответственно октоплоидное и 16-типлоидное ядро просперматоцитов I.

В результате митотического деления просперматоцитов I образуются ядра сперматоцитов I-ого порядка. На фотоиллюстрациях представлен результат деления ядер просперматоцитов I. На фото 3<sub>(5)</sub>, 3<sub>(6)</sub> и 3<sub>(7)</sub> (стр. 148) представлены соответственно три, четыре и пять вновь образовавшихся ядер сперматоцитов I-ого порядка в общей цитоплазме (присутствие в общей цитоплазме пяти ядер свидетельствует о том, что они образовались в результате

деления 20-плоидного ядра просперматоцита I). Часто некоторые из вновь образовавшихся ядер сперматоцитов I-ого порядка сразу подвергаются автолизу и разрушаются\* (например, таковы все три ядра, представленные на фото 3<sub>(5)</sub>, два ядра справа на фото 3<sub>(6)</sub> и ядро внизу на фото 3<sub>(7)</sub>, все ядра не очень интактные).

\*) Такое явление можно было наблюдать и у других изученных нами видов.

На фото 2a и 2b представлено деление октоплоидных ядер просперматоцитов I. На фото 3<sub>(1)</sub> представлены два интактных вновь образовавшихся ядра сперматоцитов I-ого порядка (в общей цитоплазме) на стадии, которую можно отнести к стадии пахитены.

После цитокинеза образуются сперматоциты I-ого порядка, ядра в которых увеличиваются в размере, благодаря чему хромосомы в них располагаются более рыхло (см. фото 3<sub>(2)</sub>, 3<sub>(3)</sub> и 3<sub>(4)</sub>)\*\*. На фото 3<sub>(2)</sub> представлено содержащее 8сДНК ядро сперматоцита I-ого порядка (которое образовалось, по-видимому, в результате деления 16-ти-плоидного ядра просперматоцита I); на фото 3<sub>(3)</sub> представлено содержащее 4сДНК ядро сперматоцита I-ого порядка.

\*\*\*) Не исключено, однако, что это явление артефактное, связанное с более лёгкой повреждаемостью клеток на этой стадии при приготовлении препаратов.

В процессе подготовки к 1-ому делению мейоза биваленты в ядрах сперматоцитов I-ого порядка укорачиваются, утолщаются (3a, 3b<sub>1</sub>, 3b<sub>2</sub>, 3c) и образуют характерную ядерную форму на стадии метафазы I (3d).

Здесь следует заметить следующее. На фото 3b<sub>1</sub> и 3b<sub>2</sub> представлены ядерные формы, примерно – на одной и той же стадии подготовки к 1-ому делению мейоза.

Но на фото 3b<sub>1</sub> представлены интактные хромосомы (практически не повреждённые при приготовлении препарата), а на фото 3b<sub>2</sub> представлены хромосомы,

которые при приготовлении препарата (в результате повреждения клетки до момента фиксации) подверглись лёгкому автолизу и приобрели вид, характерный для хромосом типа ламповых щёток.

Лёгкая «разлохмаченность» есть и у хромосом, представленных на фото 3с. Таким образом, наличие в ядрах сперматоцитов I-ого порядка хромосом типа ламповых щёток не что иное, как артефакт, возникающий при приготовлении препаратов (об этом свидетельствуют наши наблюдения и по другим видам животных, но мы приводим этот пример как наиболее демонстративный). Поэтому к появляющимся время от времени в литературе сообщениям (см., например, [17]) об обнаружении в сперматоцитах животных хромосом типа ламповых щёток следует относиться с крайней настороженностью.

На фото 3е представлена очень ранняя анафаза I, на фото 3f<sub>1</sub> представлена более поздняя анафаза I сперматоцита I-ого порядка, содержащего 8сДНК (см. фото 3(2)), на фото 3f<sub>2</sub> и 3f<sub>3</sub> – анафазы I сперматоцитов I-ого порядка, содержащих по 4сДНК.

Начиная с анафазы I-ого деления мейоза происходят события, которые приводят к элиминации половины количества ДНК, содержащейся в ядре сперматоцита I-ого порядка, и образованию в результате этого не четырёх, как можно было ожидать, а только двух ядер будущих сперматозоидов.

Происходить это может двумя путями. В одном случае в анафазе I от одной из анафазных групп отделяется та или иная хромосома (унивалента), фото 4(1) и 4(2).

Затем следует телофаза I, во время которой та из телофазных групп, от которой в анафазе I отделилась хромосома, распадается ещё на две части (8(1)). В результате, после цитокинеза образуется две клетки, одна из которых содержит образовавшуюся ранее ядерную форму сперматоцита II-ого порядка (4(3)) и вступает во 2-ое

деление мейоза, а другая содержит три абортивные ядерные формы ( $8_{(2)}$ ), которые впоследствии разрушаются.

Таким образом, в результате 1-ого деления мейоза в этом случае образуется только один сперматоцит II-ого порядка (содержащий  $2сДНК$ ). В результате 2-ого деления мейоза из этого сперматоцита II-ого порядка образуется две гаплоидные сперматиды, содержащие ядра будущих сперматозоидов ( $5_{(1)}$ ,  $5_{(2)}$  и  $5_{(3)}$ ). На фото  $4a_1$  представлены анафазные хромосомы во 2-ом делении мейоза (в распластанной на препарате клетке).

В другом случае 1-ое деление мейоза происходит нормально и приводит к образованию двух сперматоцитов II-ого порядка ( $4_{(4)}$ ), а выпадение той или иной хромосомы происходит в анафазе 2-ого деления мейоза. При этом в результате 2-ого деления мейоза из сперматоцита II-ого порядка образуется только одно ядро будущего сперматозоида (содержащее  $1сДНК$ ), а остальная часть ДНП в виде двух или большего числа фрагментов отделяется в результате цитокинеза и впоследствии разрушается.

На фото  $5_{(4)}$ ,  $5_{(5)}$  и  $5_{(6)}$  представлены различные стадии 2-ого деления мейоза до начала цитокинеза (ядра будущих сперматозоидов будут образованы из телофаз, представленных вверху на фото  $5_{(4)}$  и  $5_{(6)}$  и группы хромосом вверху на фото  $5_{(5)}$ ).

На фото 4, 5 представлен случай прохождения 1-ого и 2-ого деления мейоза в общей цитоплазме. Можно с достаточной степенью вероятности предположить, что слева образуются два нормальных гаплоидных ядра, а справа абортивные ядра.

На фото  $8_{(2)}$ ,  $8_{(3)}$ ,  $8_{(4)}$ ,  $8_{(5)}$ ,  $8_{(6)}$  представлены образовавшиеся в результате 1-ого или 2-ого делений мейоза абортивные ядра обычно круглой или неправильной формы, содержание ДНК, в которых всегда меньше  $1с$ . На фото  $8_{(6)}$  представлены два абортивных ядра, из которых образовались атипичные сперматозоиды.

Хотя у этих сперматозоидов сформированы нормальные хвосты, ядра их не способны к дальнейшим превращениям и будут в конце концов элиминированы окружающими лизирующими клетками.

Образовавшиеся в результате 2-ого деления мейоза гаплоидные ядра овальной формы (содержащие 1сДНК) с гомогеннораспределённой в них ДНК нормальных сперматид ( $7a_1$ ) затем претерпевают целый ряд последовательных превращений, сущность которых заключается, по-видимому, сначала в формировании в ядре тонкой, сложным образом уложенной нити, а затем в постепенном развёртывании этой нити (фото  $7a_1$ ,  $7b$  и  $7c_1$ ,  $7d$ ,  $7e$ ,  $7f$ ) до тех пор, пока ядро не примет вид, характерный для ядра зрелого сперматозоида ( $7_{(1)}$  и  $7_{(2)}$ ). На фото  $7(2)$  представлены ядра гаплоидного и диплоидного зрелых сперматозоидов (диплоидные сперматозоиды образуются из ядер сперматоцитов II-ого порядка).

На фотоиллюстрациях, на стр. 144–147, представлены живые клетки из семенников конька, сфотографированные в положительном фазовом контрасте (объектив  $100\times$  ап. 1,25, окуляр 4:1, фирмы Carl Zeiss; конечное увеличение то же, что и на всех других фотографиях – 1400).

При фотографировании живые клетки (в физиологическом растворе для насекомых [41]) помещали в камеру, образованную предметным и покровным стеклами (подставочками под покровным стеклом служили полоски, вырезанные из покровного стекла). В такой камере клетки не раздавливались, но были сильно сплюснуты, благодаря чему в клетках становились хорошо различимыми клеточные органоиды.

Имея значительный запас наблюдений интактных и повреждённых ядерных форм в клетках семенников конька на фиксированных и скрашенных препаратах, мы с

определённой долей вероятности можем теперь идентифицировать и такие живые клетки.

На фото  $3_{(4)}$  представлен, без сомнения, сперматоцит I-ого порядка, на фото  $4a_2$  представлен, скорее всего, делящийся сперматоцит II-ого порядка (на стадии анафазы), на этом же снимке (внизу) представлена сперматида, содержащая нормальное гаплоидное ядро - ( $7a_2$ ), образовавшееся в результате 2-ого деления мейоза.

На фото  $5_{(7)}$  представлена нормальная сперматида, содержащая почти гомогенное гаплоидное ядро и два имеющих очень характерную удлинённую форму тельца, которые образованы из митохондрий. Эти тельца, содержащие РНК (но не ДНК) представляют собой так называемые в литературе хроматоидные тельца [6, 80].

Их не следует смешивать с так называемым хондриосомным тельцем, или побочным ядром (Nebenkern), которое присутствует, как показали наши наблюдения, в единственном числе, но не в сперматиде, а в гаплоидных лизирующих клетках (фото  $9_{(1)}$  и  $9a$  и  $9_{(3)}$ ).

Существующая до настоящего времени путаница в литературе в отношении определения хроматоидных телец [80] объясняется, по-видимому, всё той же неоднократно упоминаемой нами ошибкой, а именно тем, что гаплоидные лизирующие клетки авторы принимают за сперматиды.

На фото  $7c_2$  представлена нормальная сперматида, ядро в которой уже удлинилось, а у одного из концов ядра начинает формироваться хвост будущего сперматозоида. В месте прикрепления хвоста к ядру из одного из хроматоидных телец формируется так называемая хондриосфера [43] будущего сперматозоида, а другое хроматоидное тельце (в цитоплазме, справа от ядра) постепенно разрушается (см. также фото  $7a_2$ ).

На фото  $8_{(6)}$  представлена, по-видимому, abortивная сперматида. Хотя ядро в клетке осталось круглым, уже



сформирован длинный хвост. В месте прикрепления хвоста к ядру хондриосфера не сформирована.

На фотоснимке  $5_{(8)}$ ,  $9_{(1)}$  представлены внизу ( $5_{(8)}$ ) две нормальные молодые сперматиды (при микроскопировании в них были видны по два удлинённых хроматоидных тельца), а сверху ( $9_{(1)}$ ) две гаплоидные лизирующие клетки, в цитоплазме которых видно по одному побочному ядру (Nebenkern), также образованному из митохондрий, а в ядрах видны крупные одиночные хромоцентры.

Гаплоидные клетки, которые присутствуют в семенниках конька и стрекозы (см. ниже), выполняют у насекомых, по-видимому, ту же лиоцитарную функцию, которую мы предполагаем для таких клеток у представителей других классов животных. Поэтому и у насекомых мы называем такие клетки лизирующими.

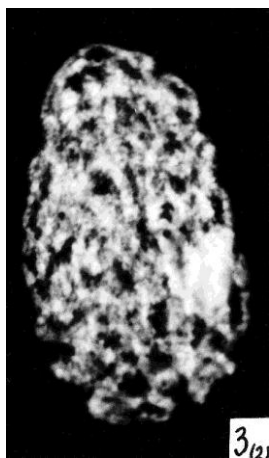
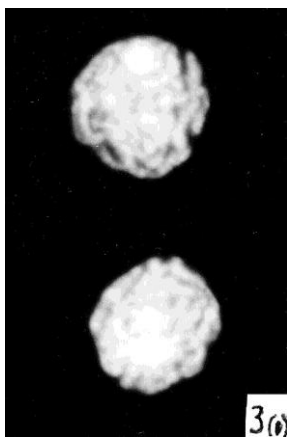
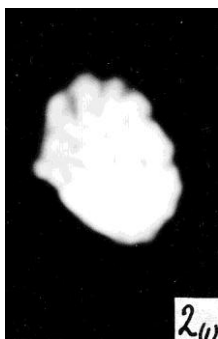
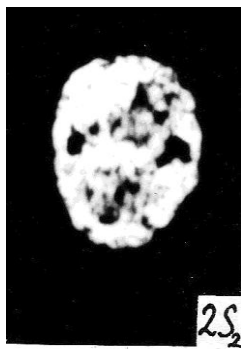
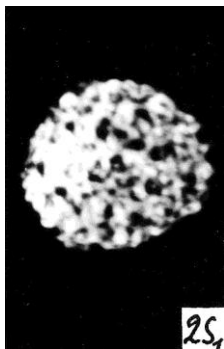
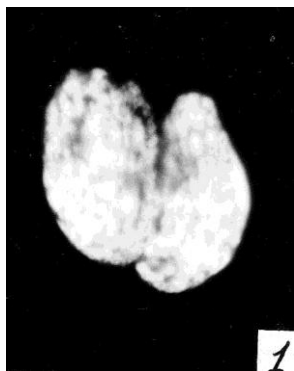
На фото  $9c_1$ ,  $9d_1$  и  $9_{(2)}$  представлены соответственно метафаза, телофаза и три интерфазных ядра (с крупными одиночными хромоцентрами) гаплоидных лизирующих клеток (люминесцентный микроскоп). На этой же фототаблице представлены микрофотографии живых лизирующих клеток в фазовом контрасте. На фото  $9a$  представлена лизирующая клетка, ядро которой, по-видимому, в профазе; на фото  $9c_2$  – лизирующая клетка, ядро которой на стадии метафазы. Затем следуют стадия анафазы ( $9d_2$ ), здесь в клетке видны характерные для лизирующих клеток несколько угловатые по очертаниям хромосомы (сравните с фото  $4a_2$ , на которой представлен сперматоцит II-ого порядка на стадии анафазы). На фото  $9e$  и  $9f$  представлены лизирующие клетки на стадии ранней и поздней телофаз и стадии цитокинеза. На фото  $9a$  –  $9f$  можно также проследить все стадии разделения митохондрия (начиная с увеличения размеров побочного ядра на фото  $9a$ ) между дочерними клетками.

И, наконец, на фото  $9_{(3)}$  представлена интерфазная лизирующая клетка. В ней видны – ядро с несколькими

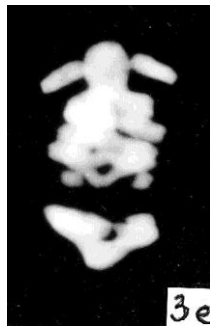
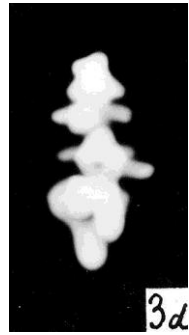
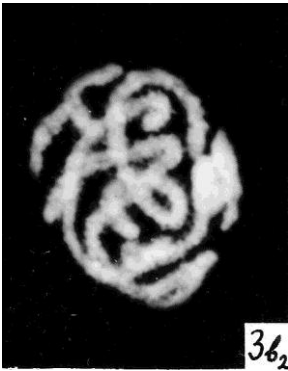
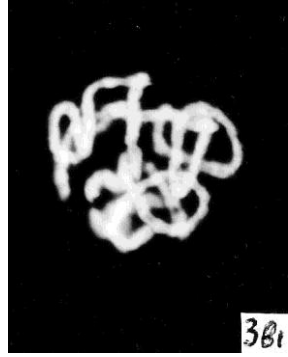
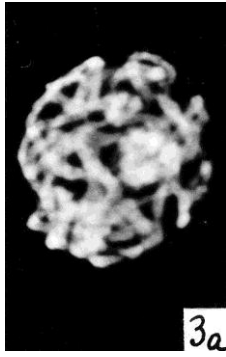
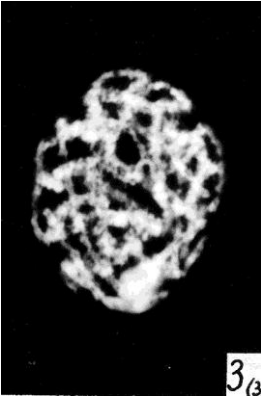
мелкими и одним крупным хромоцентрами и побочное ядро.

Интерфазные гаплоидные ядра лизирующих клеток у представителей саранчовых некоторые авторы ошибочно принимают на препаратах или за ядра сперматоцитов II-ого порядка на стадии интеркинеза, или за ядра сперматид (см., например фото *д, и, к, л* на рис. 9 в работе Кикнадзе и Высоцкой [23], а делящиеся ядра лизирующих клеток за делящиеся ядра сперматоцитов II-ого порядка на стадиях метафазы, анафазы или телофазы (фото *е, ж, з* на рис. 9 в той же работе).

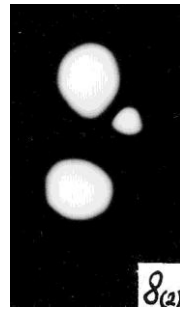
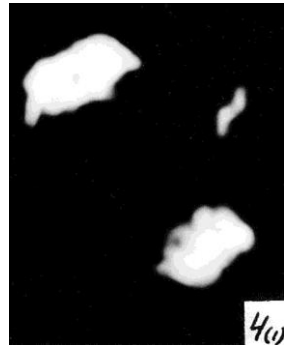
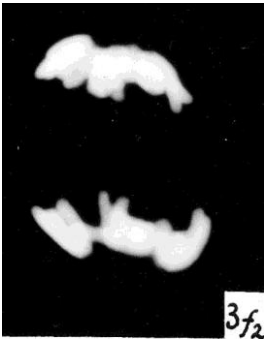
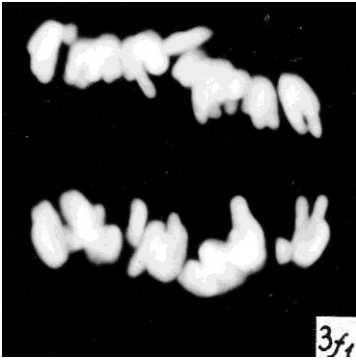
*Chorthippus apricarius* L.



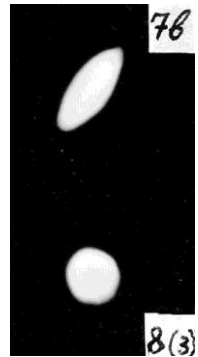
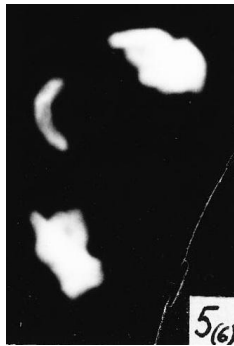
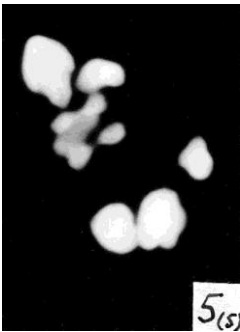
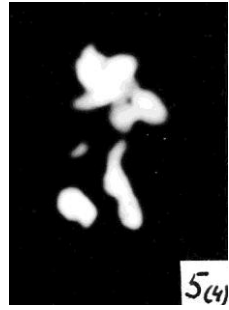
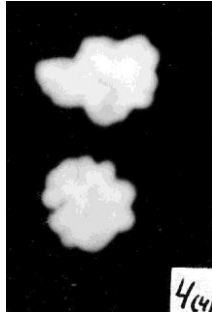
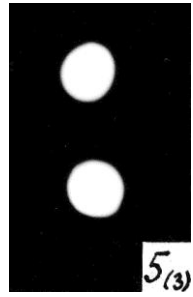
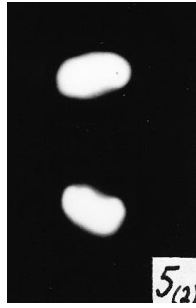
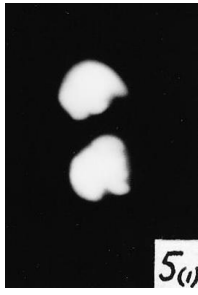
*Chorthippus apricarius* L.



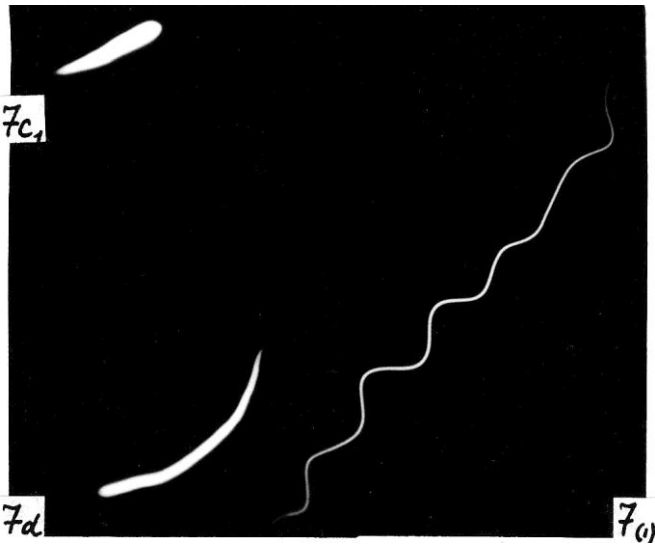
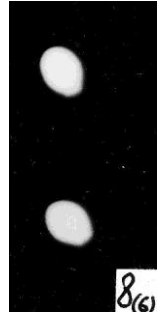
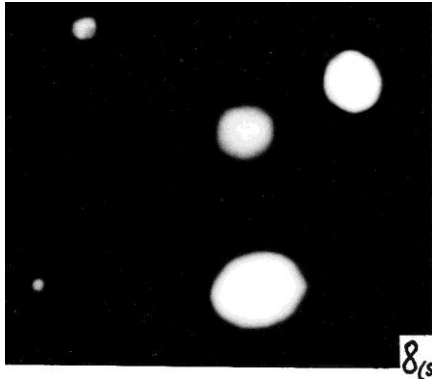
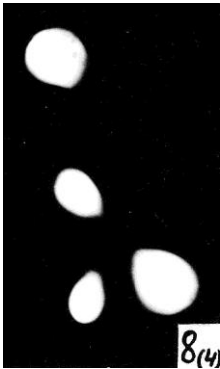
*Chorthippus apricarius* L.



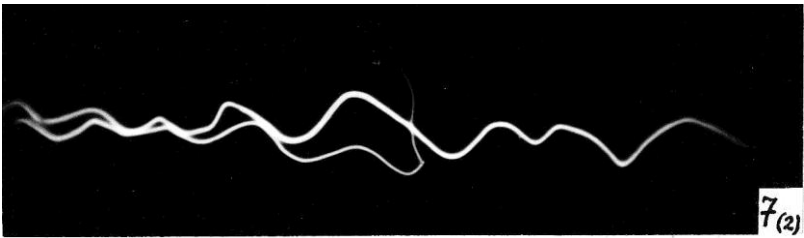
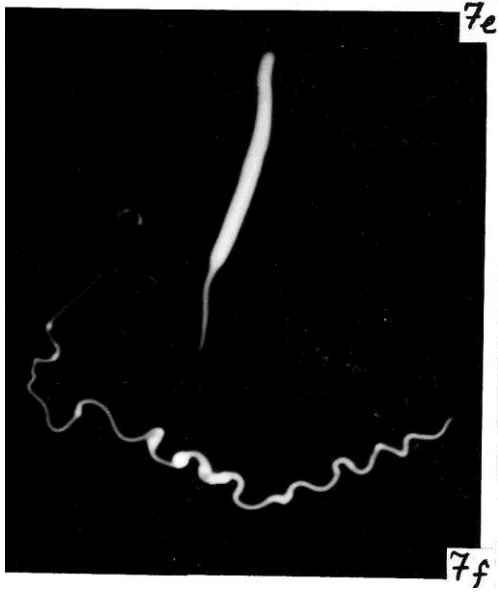
*Chorthippus apricarius L.*



*Chorthippus apricarius* L.

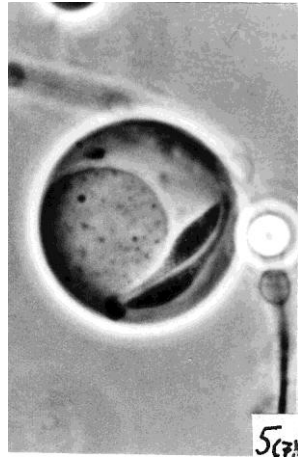
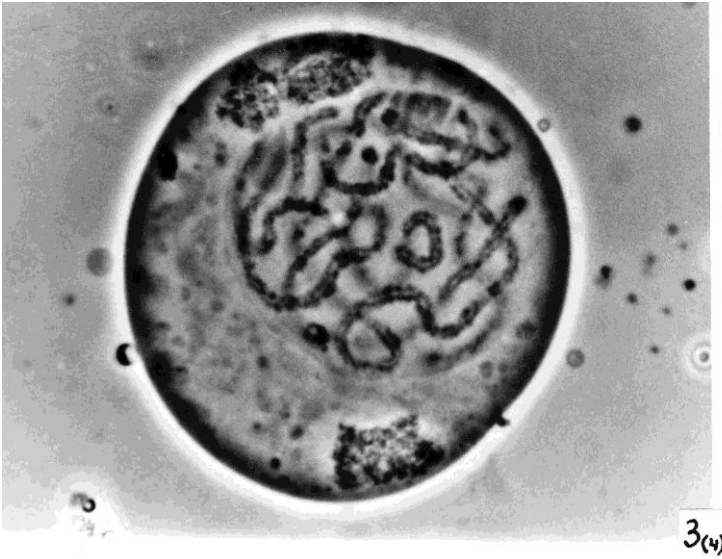


*Chorthippus apricarius* L.

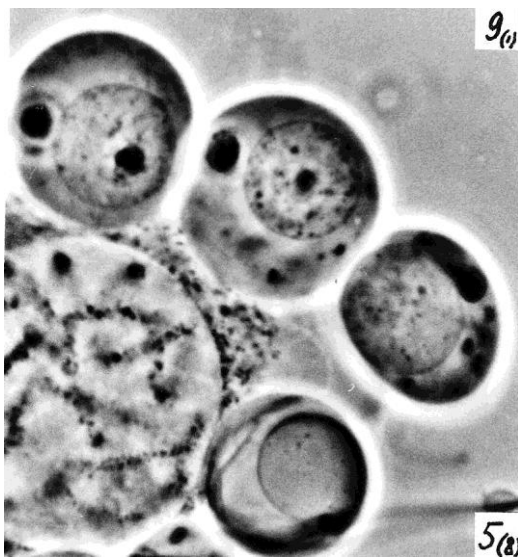
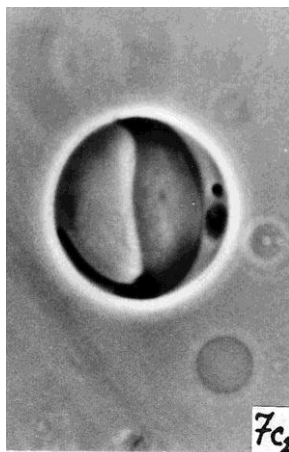




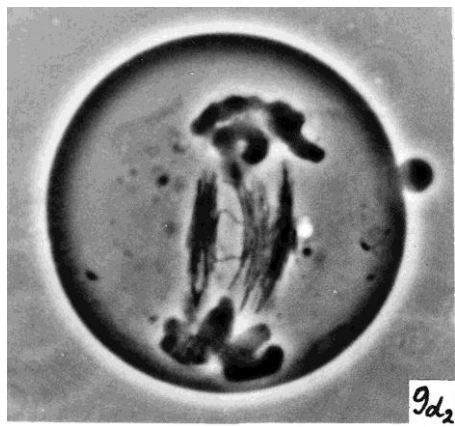
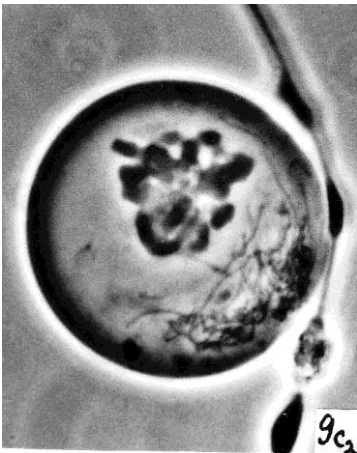
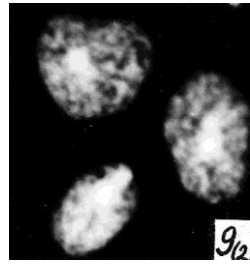
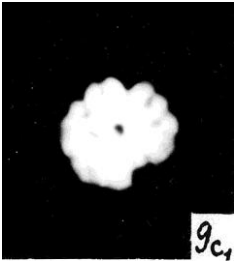
*Chorthippus apricarius* L.



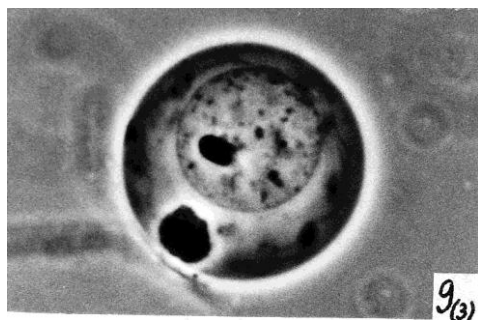
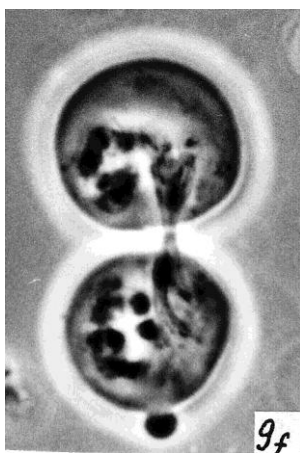
*Chorthippus apricarius L.*



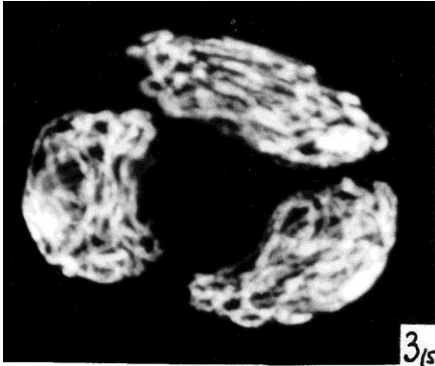
*Chorthippus apricarius* L.



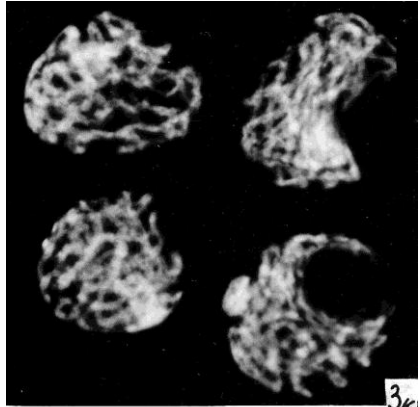
*Chorthippus apricarius* L.



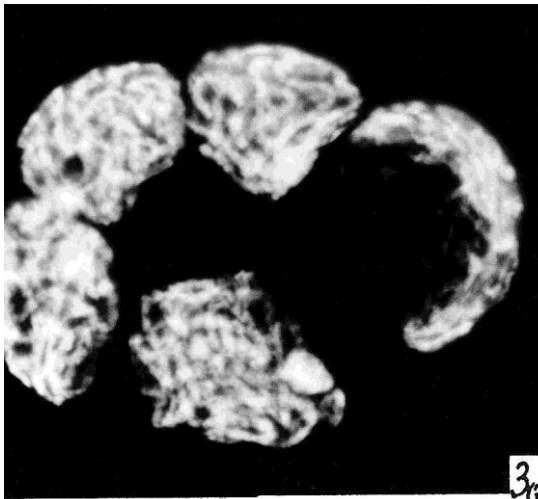
*Chorthippus apricarius* L.



3(5)



3(6)



3(7)

*p). Стрекоза желтоватая (Sumpetrum flaveolum). 2n = ?*

Материал для исследования был взят в августе 1974 г. (в период активного протекания сперматогенеза и спермиогенеза) от животных, отловленных в пределах Москвы.

Сперматогенез у стрекозы прослежен с образования сперматоцитов I-ого порядка в результате деления проспериоцитов I. На фото 2a<sub>1</sub> и 2a<sub>2</sub> представлены характерные фигуры деления ядерных форм проспериоцитов I у стрекозы, содержащие соответственно 16 и 8сДНК. На фото 2b представлена более поздняя стадия деления ядерной формы проспериоцита I, содержащей 8сДНК. На фото 3 представлены пять вновь образовавшихся ядер сперматоцитов I-ого порядка (содержащих по 4сДНК) в общей цитоплазме. Присутствие в общей цитоплазме пяти ядер сперматоцитов I-ого порядка свидетельствует о том, что они образовались в результате деления 20-плоидного ядра проспериоцита I.

После цитокинеза ядра в образовавшихся сперматоцитах I-ого порядка вступают в мейотическое деление, которое у стрекозы (как и у конька) может происходить двумя путями.

В одном случае в результате 1-ого деления мейоза (которое происходит без видимого формирования отдельных хромосом в ядерной форме) ядерная форма сперматоцита I-ого порядка распадается обычно на четыре части: ядерную форму сперматоцита II-ого порядка (содержащую 2сДНК), одну мелкую ядерную форму (образующуюся, по-видимому, из материала какой-то одной хромосомы) и две ядерные формы, содержание ДНК в каждой из которых меньше величины 1с (на фото 3а и 4<sub>(1)</sub>, 8<sub>(1)</sub> представлены последовательные этапы такого деления). Из крупного фрагмента (4<sub>(1)</sub>), содержащего

2сДНК (на фотоснимке  $4_{(1)}$ ,  $8_{(1)}$ , наверху), образуется ядерная форма будущего сперматоцита II-ого порядка, а из трёх других фрагментов ДНП ( $8_{(1)}$  на фотоснимке  $4_{(1)}$ ,  $8_{(1)}$ , внизу) образуются три abortивные ядерные формы. После цитокинеза эти abortивные ядерные формы ( $8_{(2)}$ ) впоследствии разрушаются, хотя вначале из них могут и быть образованы атипичные сперматозоиды.

Образовавшаяся из крупного фрагмента ДНП ядерная форма сперматоцита II-ого порядка после цитокинеза вступает во 2-ое деление мейоза (на фото  $5_{(1)}$  представлена анафаза этого деления), в результате которого образуются две нормальные гаплоидные сперматиды, содержащие по 1сДНК (фото 7а).

В другом случае в процессе подготовки к 1-ому делению мейоза в ядре сперматоцита I-ого порядка обособляются хромосомы (биваленты?), образующие метафазу I. Затем следует анафаза I ( $4_{(2)}$ ) и цитокинез. Без видимого интеркинеза ядерные формы ( $4_{(2)}$ ) в образовавшихся сперматоцитах II-ого порядка распадаются на три фрагмента (фото  $5_{(2)}$  и  $5_{(3)}$ ), крупный из которых содержит 1сДНК, а два мелких — примерно по 0,5сДНК. После цитокинеза образуются две клетки, одна из которых представляет собой нормальную гаплоидную сперматиду. Два abortивных ядра (содержащих по 0,5сДНК) после цитокинеза оказываются в другой клетке и могут превратиться в атипичные сперматозоиды ( $8_{(3)}$ ), которые, однако, остаются неподвижными и впоследствии разрушаются.

Нормальные гаплоидные ядра, образовавшиеся в результате 2-ого деления мейоза в поздней телофазе принимают овальную слегка заострённую с одного конца форму (7а). В процессе спермиогенеза эти ядра постепенно удлиняются и превращаются в ядра нормальных зрелых сперматозоидов, содержащих по 1сДНК (фото 7).

На фото 9 представлены четыре ядра гаплоидных лизирующих клеток (содержащие по 1сДНК).

Таким образом, у двух изученных нами видов насекомых в результате делений мейоза из ядра сперматоцита I-ого порядка образуется только два ядра нормальных сперматозоидов, а остальная часть ДНП (50%) рано или поздно элиминируется. Перераспределение ДНП у насекомых происходит, по-видимому, в процессе подготовки к 1-ому или 2-ому делениям мейоза.

В заключение следует остановиться на работах других авторов, в которых получены результаты очень сходные с теми, которые получены нами при изучении спермиогенеза у конька и стрекозы.

Так, в работе, посвящённой исследованию гетерохроматизации части ядерного материала в эмбриональных клетках насекомых [63] авторы обнаружили, что у трёх видов насекомых, относящихся к подотряду червецов и щитовок (кокцид), в процессе спермиогенеза из ядра сперматоцита I-ого порядка вместо четырёх образуется только два ядра будущих сперматозоидов, а остальная часть ядерного материала дегенерирует. Однако подлинное значение обнаруженного явления не было должным образом оценено авторами этого исследования [63]. По-видимому, по этой причине и до настоящего времени результаты, полученные в этом исследовании, упоминаются другими авторами или только в качестве примера редкого случая гетерохроматизации и дегенерации целых гаплоидных наборов хромосом в процессе спермиогенеза у насекомых [23], или только в связи с проблемой гетерохроматина [31, 47].

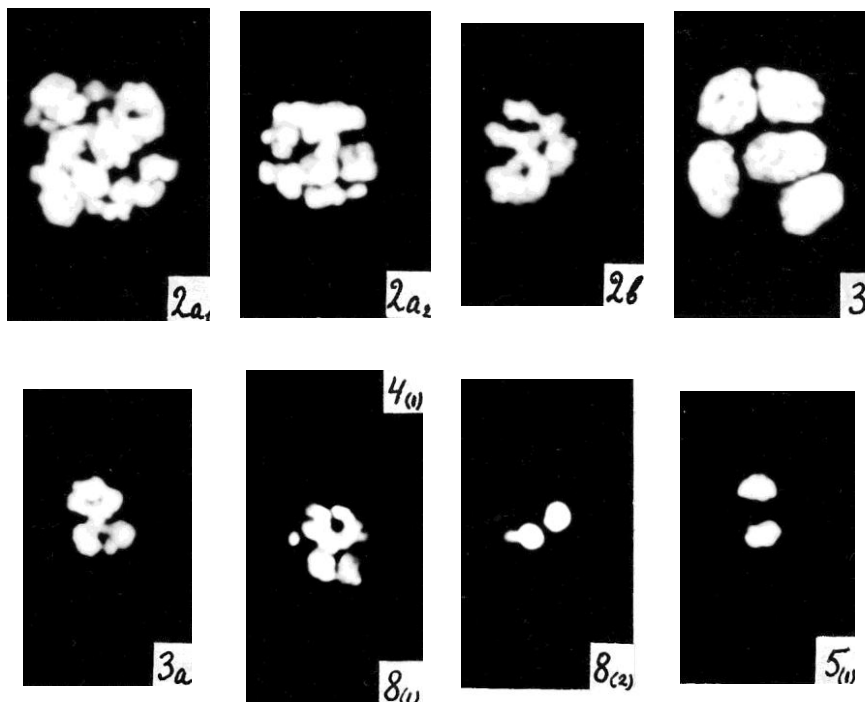
Чрезвычайно интересны в данном случае и результаты исследований Мевеса (Meves, 1907; цитирую по [43]), который обнаружил, что у гаплоидного трутня из ядра сперматоцита I-ого порядка в результате двух делений



мейоза (в первом из которых от клетки отшнуровывается участок цитоплазмы, лишённый ядра) образуются редуционные тельце и только одно ядро будущего сперматозоида.

Всё вышеизложенное, без сомнения, свидетельствует об универсальности явления элиминации половины количества ДНК в процессе спермиогенеза у насекомых.

*Sumpetrum flaveolum L.*



*Sumpetrum flaveolum* L.



### **3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, НЕКОТОРЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ И НАБЛЮДЕНИЯ**

#### **1. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ**

Прежде всего следует отметить, что результаты настоящего исследования показывают, что снижение окрашиваемости ядер зрелых сперматозоидов у млекопитающих в два раза по сравнению с ожидаемой для гаплоидных ядер не артефакт нуклеальной реакции Фельгена (или окрашивания ДНК по методу галлоцианин-хромовые квасцы) в результате влияния белков, входящих в состав ДНП, как это считают некоторые авторы [11, 19, 20, 32, 42, 66–70], а отражение элиминации половины количества ДНК из ядер молодых сперматид при формировании ядер зрелых сперматозоидов.

Отсутствие снижения содержания ДНК в процессе спермиогенеза у быка, наблюдаемое Гледхиллом с соавторами [67, 69] при исследовании содержания ДНК с помощью микроспектрофотометрии в ультрафиолете или при измерениях сухой массы можно объяснить только методическими ошибками. Слишком большая вера в результаты, полученные с помощью микроспектрофотометрии в ультрафиолете, привела упомянутых авторов к неверному решению всей проблемы. Основываясь на этих результатах, авторы подвергли сомнению объективность результатов, получаемых при использовании нуклеальной реакции Фельгена. Этому способствовали также ошибочные результаты, полученные авторами при измерениях относительного содержания основных белков в ядрах на различных стадиях спермиогенеза у быка. Напомним, что, как это уже отмечалось выше, Гледхилл с соавторами в своих

исследованиях [67, 68] ошибочно принимал гаплоидные ядра лизирующих клеток за ядра молодых сперматид.

Полученные нами результаты свидетельствуют также о том, что нет никаких различий в чувствительности ДНК или ДНП к кислотному гидролизу в фиксированных клетках различных типов. Это подтверждают, в частности, результаты цитофлуориметрического анализа относительных количеств ДНК в клетках различных видов животных (табл. 1), которые хорошо согласуются с результатами, полученными другими методами.

Обнаруженные некоторыми авторами различия в связывании 2-этокси-6,9-диаминоакридина ядрами клеток печени после частичной гепатэктомии и ядрами раковых клеток по сравнению с контрольными после кратковременного кислотного гидролиза [21, 25, 83] объясняются, конечно, не различиями в чувствительности ДНК к кислотному гидролизу в сравниваемых клетках, как это считают упомянутые авторы, а тем, что при кратковременном кислотном гидролизе (гидролиз в течение 2-х минут при 60°C в 1N HCl) РНК удаляется из ядер фиксированных клеток не полностью, но приобретает способность связывать 2-этокси-6,9-диаминоакридин. Поэтому результаты цитофлуориметрии ядер сравниваемых клеток, окрашенных по люминесцентной модификации метода Фельгена после кратковременного кислотного гидролиза отражают (с большей или меньшей точностью) различия в содержании высокополимерной РНК в ядрах сравниваемых клеток\*.

В свете полученных нами результатов становится понятной «необъяснимая» стерильность быков, у которых, по словам Гледхилла [68], снижение окрашиваемости ядер сперматозоидов по методу Фельгена выражено значительно меньше, чем в зрелых сперматозоидах нормальных фертильных быков. Теперь уже достаточно ясно, что элиминация половины количества ДНК из ядер

сперматид в процессе спермиогенеза у млекопитающих является необходимым условием образования фертильных сперматозоидов\*\*. Не исключено, что при сравнительном биохимическом изучении семенников таких стерильных и фертильных животных будут обнаружены те биохимические факторы, присутствие которых необходимо для нормального протекания элиминации половины количества ДНК в процессе спермиогенеза, что имело бы важное значение для животноводства и медицины.

\*) Известно, что количество ядерной РНК в клеточном ядре может быть значительным (в печени крысы ядерная РНК составляет около 20% от общего содержания нуклеиновых кислот) и сильно варьирует в зависимости от типа ядер [16]. Также известно, что регенирирующая печень содержит РНК, не присутствующую ранее в нормальной печени [65].

\*\*\*) В литературе можно встретить утверждения, что уменьшение относительного содержания ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов у человека и быка характерно для стерильной спермы [45, 73–75].

## 2. УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ ЯВЛЕНИЯ ЭЛИМИНАЦИИ ЗНАЧИТЕЛЬНОЙ ЧАСТИ ДНК ПРИ СМЕНЕ ЯДЕРНЫХ ФОРМ В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ РАЗВИТИЯ ОРГАНИЗМОВ И ВОЗМОЖНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЭТОГО ЯВЛЕНИЯ

Как показывает анализ того, что известно в настоящее время в биологии, обнаруженное нами явление элиминации половины количества ДНК, содержащегося в ядрах сперматоцитов I-ого порядка, в процессе спермиогенеза у животных является звеном в единой цепи явлений, происходящих при смене ядерных форм в жизненном цикле развития самых различных организмов. Приведём некоторые примеры.

Известно, что при образовании яйцеклеток у животных из четырёх ядер, образующихся в результате двух последовательных делений созревания ооцита, только одно ядро превращается в ядро яйцеклетки, а остальные три ядра дегенерируют [3, 6, 28, 34, 39, 48].

У покрытосеменных растений гаплоидные ядра четырех микроспор (образовавшихся в результате двух последовательных делений мейоза микроспороцита) делятся митотически надвое и образуют в каждой микроспоре вегетативную и генеративную клетки. Ядро вегетативной клетки впоследствии разрушается (обычно во время роста пыльцевой трубки), а из генеративного ядра в результате митотического деления образуются два ядра спермиев, участвующих в двойном оплодотворении [30, 37].

Тут следует заметить, что в обширной литературе, посвящённой изучению микроспорогенеза у покрытосеменных растений, нет ни одной работы, в которой было бы уделено внимание анализу относительного содержания

ДНК в ядрах одноядерных и двуядерных микроспор и в ядрах спермиев. Нет в литературе и никаких указаний на то, что перед митотическим делением, приводящим к образованию вегетативного и генеративного ядер или ядер спермиев предварительно происходит редупликация ДНК. Этот чрезвычайно важный вопрос до настоящего времени не привлёк к себе должного внимания.

О том, что при образовании спермиев в результате митотического деления генеративного ядра нет предварительной редупликации ДНК в генеративном ядре, свидетельствуют, в частности, результаты проведённого нами цитофлуориметрического анализа относительного содержания ДНК в двухъядерной и трёхъядерной пыльце, а также в делящихся генеративных ядрах и спермиях в пыльцевых трубках тюльпана (*Tulipa vvedenskyi* Z. Botsh). Результаты измерений, представленные в таблице 6, свидетельствуют об отсутствии предварительного синтеза ДНК в генеративном ядре перед делением, приводящим к образованию двух ядер спермиев. Поэтому, если учесть, что у покрытосеменных растений в образовании зиготы (развивающейся затем в зародыш будущего растения) участвует только один из спермиев, то, по-видимому, можно считать, что в этом случае, в сущности, имеет место элиминация половины количества ДНК, содержащейся в ядре генеративной клетки, которая, правда, выражена очень своеобразно.

Таблица 6

Результаты цитофлуориметрии ДНК в двухъядерной и трёхъядерной пыльце, делящихся генеративных ядрах и ядрах спермиев тюльпана (*Tulipa vvedenskyi* Z. Botsh)\*

Тип ядер	Число измерений	Интенсивность люминесценции в усл. ед. ( $\bar{x} \pm \delta$ )	К.В. (%)	Относительное содержание ДНК
Двухъядерная и трёхъядерная пыльца	11	360,0 ± 4,5	1,2	3,95
Делящиеся генеративные ядра (метафазы и анафазы в пыльцевых трубках)	7	180,0 ± 10,0	4,1	1,98
Ядра спермиев (в пыльцевых трубках)	9	91 ± 3,16	3,5	1.00

\*) Пыльцу тюльпана проращивали во влажной камере в течение 12-ти часов при 20–22°C на предметных стёклах, покрытых тонким слоем сахарно-агаровой среды (15%-ный раствор рафинада в 2%-ном растворе агар-агара в дистиллированной воде). По окончании проращивания клетки на предметных стёклах, покрытых сахарно-агаровой средой, фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты и окрашивали по люминесцентной модификации метода Фельгена, как это описано выше для животных клеток (стр. 13–17). Пыльцевые зёрна, прорастающие с запозданием, содержали два ядра (вегетативное и генеративное) или три ядра (вегетативное и два ядра спермиев). В таких пыльцевых зёрнах измеряли суммарное содержание ДНК. Содержание ДНК в вегетативных ядрах по мере роста пыльцевых трубок падало от 180 усл. ед. до 70 усл. ед. При цитофлуориметрии использовали объектив



планахромат 40× ап. 0,65 (фирмы Carl Zeiss). В таблице приведены результаты одного из двух опытов, давших сходные результаты.

У голосеменных растений один из образовавшихся спермиев при оплодотворении разрушается [5].

При мегаспорогенезе у покрытосеменных растений в случае образования моноспорического зародышевого мешка, после двух делений мейоза продолжает развиваться только одна мегаспора, а остальные три дегенерируют, а в случае образования биспорического зародышевого мешка продолжает развиваться одна из двух клеток, образовавшихся в результате 1-ого деления мейоза, а другая дегенерирует [30, 37]. В случае образования тетраспорических зародышевых мешков, цитокинеза после 1-го и 2-го делений мейоза не происходит, и образуются не четыре отдельные мегаспоры, а четыре ядра в общей цитоплазме. Однако и в этом случае яйцеклетку образует в результате последующих митотических делений только одно из четырёх ядер [30, 37].

При мегаспорогенезе у голосеменных растений из образующихся четырёх гаплоидных макроспор три макроспоры дегенерируют [5].

В случае зиготического мейоза у конъюгат (*Spirogyra*, *Ziganea*) из образовавшихся четырёх ядер только одно ядро в дальнейшем развивается в гаплонт, а остальные три ядра дегенерируют [5, 6].

У простейших, в частности у ресничных инфузорий, при половом размножении, которое также связано с конъюгацией (попарным соединением особей) – макронуклеусы в каждой из конъюгирующих особей дегенерируют, а микронуклеусы дважды делятся (эти деления соответствуют двум делениям мейоза у многоклеточных организмов), в результате чего в каждой клетке образуется по четыре гаплоидных ядра, из которых

три рассасываются, а одно остаётся. Затем следует митотическое деление гаплоидных ядер в конъюгирующих особях (в результате в каждой особи образуется по два гаплоидных ядра, одно из которых называют стационарным, а другое мигрирующим), обмен мигрирующими ядрами, образование диплоидных синкарионов и расхождение конъюгатов. После образования макронуклеуса и микронуклеуса (в результате деления синкариона надвое) инфузории приступают к обычному размножению делением [36].

Явление элиминации части ДНК при смене клеточных форм наблюдается и у прокариотов. Так, по данным Ритер [78], полученным при электронно-микроскопическом изучении *Bacillus subtilis* Marburg, при образовании споры часть палочковидного нуклеоида в вегетативной клетке отделяется, окружается оболочкой и становится нуклеоидом споры. Оставшаяся часть нуклеоида распадается и исчезает.

Более определённые результаты в этом отношении были получены нами при цитофлуориметрическом анализе ДНК в клетках *Bac. megaterium* при спорообразовании. Материалом исследования при этом служила односуточная культура *Bac. megaterium*, выращенная на картофельном агаре при 37°C. Приготовление, окрашивание на ДНК и заключение в ртуть окрашенных препаратов проводили по методам, которые были специально разработаны нами для такого рода исследований [51, 54].

Измерения относительных количеств ДНК, которые были проведены с достаточной точностью, показали, что нуклеоиды образующихся спор содержат половину количества ДНК, первоначально содержащегося в нуклеоиде вегетативной клетки, а остальная часть ДНК вегетативной клетки постепенно элиминируется в процессе спорообразования (таблица 7).

Таблица 7

Результаты цитофлуориметрии ДНК в ядрах гаплоидных лизирующих клеток петуха, в нуклеоидах вегетативных клеток и спор *Vac. megaterium* и нуклеоидах клеток *Vac. coli*. \*

Вид	Тип клеток	Число измерений	Интенсивность люминесценции в усл. ед. ( $\bar{x} \pm \delta$ )	К. В. (%)	Относительное содержание ДНК (между видами, а также в вегет. клетках и спорах <i>Vac. meg.</i> )	
Петух	Лизирующие клетки (1n, 1c)	10	588,0±15,87	2,7	1,0000	
<i>Vac. megaterium</i> (односуточная культура)	Вегетативные клетки	32	19,7 ± 1,49	7,0	0,033	2,03
	Споры	13	9,7 ± 0,06	0,6	0,016	1,00
<i>V. coli</i> (трёх-часовая культура)	Вегетативные клетки	29	5,3 ± 0,82	15,3	0,009	

\*) Окрашивание препаратов клеток представленных в таблице видов по люминесцентной модификации метода Фельгена проведено одновременно; измерения проведены при одной чувствительности цитофлуориметра (при напряжении на ФЭУ-39, равном 1200 в.) Окрашивание на ДНК и заключение окрашенных препаратов в ртуть проведены по методам, разработанным ранее [51, 54].

На фото 1 стр. 169 представлены живые вегетативные клетки и клетки на различных стадиях спорообразования односуточной культуры *Vac. megaterium* в положительном

фазовом контрасте (объектив 100× ап. 1,25, окуляр 3× гомаль, конечное увеличение 1400). На фото 2 представлены нуклеоиды в шести вегетативных клетках, на фото 3 – стадии образования («выпочковывания») нуклеоидов будущих спор из нуклеоидов вегетативных клеток, на фото 4 – стадии элиминации ДНК, на фото 5 (внизу) – относительно очень маленькое ядро зрелой споры, содержащее половину количества ДНК, первоначально содержащегося в нуклеоиде вегетативной клетки (люминесцентный микроскоп, препараты заключены в ртуть, объектив 100× ап., 1,32; окуляр 3× гомаль, конечное увеличение 1400).

Что касается неспорообразующих бактерий, таких как *Vac.coli*. то целым рядом авторов было показано, что при конъюгации бактериальных клеток генетическая рекомбинация между родительскими штаммами возникает в результате переноса 1/3–1/10 всего количества ДНК из клетки донора в клетку реципиента [8]. Особое внимание в данном случае обращает на себя то обстоятельство, что клетки реципиенты после перехода в них чужой ДНК начинают делиться, а клетки доноры гибнут.

Можно ожидать, что число подобных примеров будет расти по мере того, как будет расти число детальных кариоморфологических и цитофотометрических исследований на всё большем числе видов.

Однако уже приведённые примеры охватывают настолько значительное число видов, что можно с достаточной уверенностью считать явление элиминации значительной части ДНК (как правило – не менее половины), при смене ядерных форм в жизненном цикле развития организмов, явлением универсальным. Остановимся на вопросе о возможном биологическом значении этого явления.

Из всех возможных предположений наиболее вероятным нам представляется предположение о том, что явление элиминации значительной части ДНК в процессе спермиогенеза у животных и в остальных случаях, перечисленных выше, представляет собой эффективный антимутационный механизм, возникший в процессе эволюции, который обеспечивает само существование отдельных видов организмов в условиях мутационного давления окружающей среды.

Именно существованием такого механизма, по-видимому, можно объяснить сравнительно очень низкую наследуемость в последующих поколениях мутаций, вызванных радиоактивным облучением и химическими мутагенами. Известно, что при сравнительно низких уровнях радиоактивности фона не удаётся обнаружить никаких генетических и морфологических изменений у особей в течение многих поколений [13]. Здесь, по-видимому, уместно упомянуть исследования популяции жителей и исследования популяции чёрных крыс в индийском штате Корал, где естественный радиационный фон значительно превышает (в 7–10 раз) фон в большинстве районов земного шара из-за содержания в земле в этом штате значительного количества соединений тория [9, 26, 59]. При исследовании жителей этого района не было обнаружено никаких отклонений в рождаемости, сроках беременности и смертности среди новорождённых [26]. Не было обнаружено никаких отклонений от нормы и среди живущих на небольшом острове в упомянутом штате чёрных крыс [59]. Также не было обнаружено никаких генетических изменений в популяциях микрофлоры и микрофауны в пресноводных водоёмах в Окридже, загрязнённых радиоактивными отходами [59].

На основании полученных нами результатов при исследовании спермиогенеза у животных и на основании примеров элиминации ДНК при смене ядерных форм в

жизненном цикле организмов, рассмотренных выше, можно, по-видимому, предположить существование элиминации мутаций не только на уровне отбора индивидуумов в популяции или на уровне отбора зигот, но и на уровне отбора ДНК при образовании гамет. Возможно, что при образовании половых клеток животных и растений, а также в других случаях (таких, например, как спорообразование у бактерий) при элиминации ДНК происходит, главным образом, элиминация дефектных молекул или участков молекул ДНК, возникших под воздействием мутагенных факторов\*.

\*) Следует заметить, что характер элиминации половины количества ДНК из ядер сперматид в процессе спермиогенеза у млекопитающих, способ образования спермиев у покрытосеменных растений, элиминация половины количества ДНК при образовании спор у *Vas. megaterium* свидетельствуют о том, что хромосомы в гаплоидных ядрах сперматид у млекопитающих, в генеративных ядрах покрытосеменных растений и нуклеоиды в вегетативных клетках *Vas. megaterium* представлены не одиночными молекулами ДНК, а, по крайней мере, двумя двухспиральными молекулами ДНК. Что же касается животных таких классов как птицы, пресмыкающиеся, земноводные, рыбы, моллюски и насекомые, то в этом случае сделать какое-либо заключение о числе молекул ДНК в хромосомах нельзя, так как у животных этих классов при спермиогенезе элиминируются, как мы видели выше, целые гаплоидные наборы хромосом.

Предположение о возможной антимутационной роли явления элиминации ДНК при образовании половых клеток подкрепляется, в частности, тем, что деления созревания ооцитов у животных происходят непосредственно перед оплодотворением или даже после проникновения сперматозоида в ооцит.

Сложнее обстоит дело в отношении зрелых сперматозоидов. Сперматозоиды, как правило, образуются задолго до оплодотворения и, следовательно, в течение всего этого времени подвергаются воздействию мутагенных факторов. Известно, например, что в теле оплодотворённой пчелиной матки живая сперма сохраняется в течение нескольких лет и служит всё это время для оплодотворения яиц [34].

До настоящего времени нет достаточно определённых экспериментальных доказательств того, что зрелые сперматозоиды мутационно более устойчивы, при сравнительно слабых мутагенных воздействиях, чем половые клетки на более ранних стадиях спермиогенеза [28].

С другой стороны, известна значительная лучевая резистентность зрелых сперматозоидов к высоким дозам ионизирующих излучений по сравнению с половыми клетками на более ранних стадиях. Так, у человека при дозе облучения 55000 рентген сперматозоиды теряют свою подвижность только на 30%, в то время как половые клетки на более ранних стадиях необратимо гибнут при облучении семенников человека в дозе 500–600 рентген (при дозе 250 рентген спермиогенез у человека восстанавливается только через год), [49].

Значительная лучевая резистентность зрелых сперматозоидов, по-видимому, указывает на их более высокую устойчивость и к сравнительно слабым мутагенным воздействиям. Основанием для такого предположения может служить также и то, что ядра зрелых сперматозоидов имеют очень своеобразную квазикристаллическую упаковку ДНП [82], что также может обеспечить устойчивость ДНК в ядрах зрелых сперматозоидов к воздействиям естественного сравнительно низкого мутагенного фона.

Всё вышеизложенное позволяет предположить, что мейоз служит не только для рекомбинации родительских признаков в процессе кроссинговера, но и для удаления на том или ином этапе мейоза дефектных генов (или отдельных участков генов?) и тем самым способствует сохранению качественной определённости вида в течение известного геологического времени, что по современным воззрениям [60] является одним из важнейших признаков вида.

Обнаруженный нами факт, что сперматоцита I-ого порядка у животных образуются не в результате «роста» диплоидных сперматогоний, а в результате митотического деления высокоплоидных просперматоцитов I\*, и характер протекания спермиогенеза у различных видов свидетельствуют о том, что кроссинговер происходит не в профазе мейоза, как это считали до настоящего времени, а на тех стадиях спермиогенеза, которые мы (при рассмотрении спермиогенеза у отдельных видов животных) определяли как стадии перераспределения ДНП. На этих стадиях перераспределения ДНП, по-видимому, и происходит рекомбинация родительских признаков и удаление из генетического материала будущих сперматозоидов дефектных молекул (или участков молекул) ДНК, которая затем элиминируется.

\*) Возможно, что микроспороциты у высших растений образуются сходным образом. Этот вопрос требует специальных исследований.

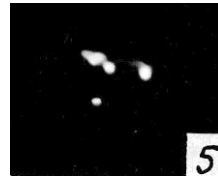
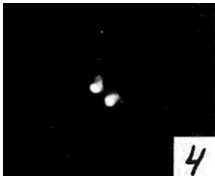
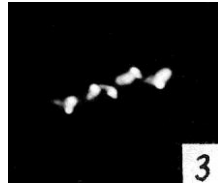
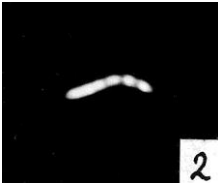
На возможность отбора генетического материала (ДНК) при образовании гамет указывает также существование так называемого мейотического дрейфа, сущность которого заключается в том, что организм гетерозиготный по какой-то паре аллелей передаёт в потомстве эти аллели в отношении, значительно отличающимся от отношения 1:1 [84], что приводит в



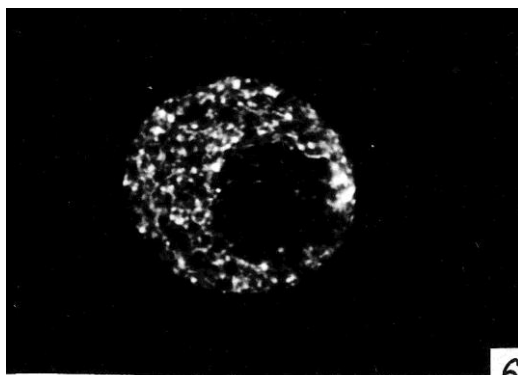
результате также к отбору в пользу гетерозигот [14, 47]. Это приводит также при малых выборках к отклонениям от менделевского соотношения фенотипов в потомстве и возрастанию степени полиморфизма в популяциях [47].

Если до настоящего времени наиболее вероятной гипотезой, объясняющей механизм мейотического дрейфа, представлялась гипотеза о существовании генетического контроля в организме самок, приводящего к преимущественному оплодотворению сперматозоидами данного типа [47], то теперь, после обнаружения явления элиминации половины количества ДНК в процессе спермиогенеза у животных, мейотический дрейф, можно связывать, по-видимому, и с отбором на уровне гамет (также женских). Возможность существования такой презиготной селекции предполагает Терци [47].

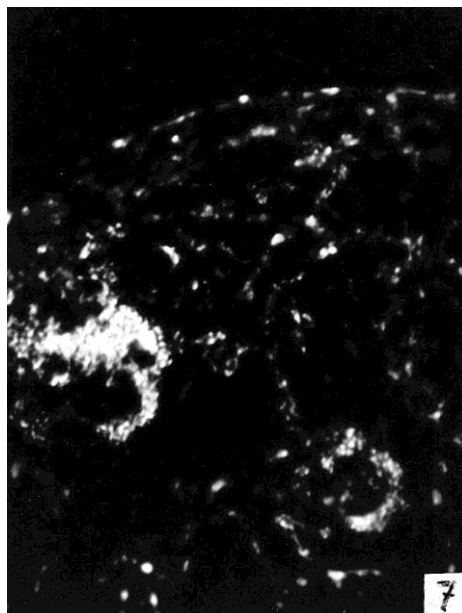
*Bac. megaterium*



*A. mutabilis* (ядро ооцита)



*R. ridibunda* (участок ядра ооцита)



#### **4. ОБЛАСТИ НАУЧНОГО И ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОБНАРУЖЕННОГО ЯВЛЕНИЯ**

Обнаруженное нами явление элиминации половины количества ДНК, содержащегося в ядрах сперматоцитов I-ого порядка, в процессе спермиогенеза у животных имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Отбор на уровне генетического материала (возможность существования которого мы рассмотрели выше) делает более понятной и конкретной взаимосвязь явлений консерватизма наследственности видов и их изменчивости.

Знание о существовании обнаруженного явления элиминации ДНК будет, по-видимому, способствовать дальнейшему развитию наших представлений о механизме возникновения мутаций и их наследования, о механизме гетерозиса, уточнению генетического анализа при селекционных работах, при изучении генетических процессов в популяциях и при изучении наследственных заболеваний человека. Не исключено, что знание о существовании обнаруженного явления будет использовано и при изучении раковых заболеваний\*.

\*) Стало своеобразной традицией, согласно которой всякое вновь обнаруженное биологическое явление авторы стремятся тем или иным путём приспособить для борьбы с заболеванием раком, что, конечно, находит своё оправдание не только в силу грозности этого заболевания, но и в силу его важности как сложнейшей биологической проблемы. Следуя этой традиции, сделаем такое замечание. Какой бы ни была причина рака (мутагенное воздействие или вирусная инфекция) все исследователи сходятся в том, что раковые клетки возникают из нормальных в результате нарушений в генетическом материале клеток, а именно в ДНК. Поэтому совершенно

особый интерес представляет обнаружение тех биохимических факторов, присутствие которых в семенниках животных необходимо для образования фертильных сперматозоидов, так как, если наше предположение об антимулационной роли явления элиминации ДНК в процессе спермиогенеза окажется правильным, то не исключено, что сходным образом искусственно вызванная элиминация дефектной ДНК в раковых клетках (или полный распад ядер в них на элиминируемые тела) даст желаемый эффект.

Кроме того, знание о существовании явления элиминации половины количества ДНК, содержащегося в ядрах сперматоцитов I-ого порядка, в процессе спермиогенеза у животных и элиминации значительной части ДНК при смене ядерных форм в жизненном цикле развития организмов может повысить эффективность исследований в области генной инженерии и селекции, так как экспериментальное нарушение протекания этого явления (ослабление его реализации при образовании гамет или смене ядерных форм у тех или иных организмов) даст возможность получать и сохранять большее число мутантных или соответственно трансформированных форм для их последующего отбора в хозяйственных целях.

С другой стороны (и это может оказаться главным практическим результатом настоящего исследования) само существование этого явления должно нас очень насторожить, так как у этого явления (которое, как мы видели, является необходимым условием образования нормальных гамет), как и всякого другого биологического приспособления, должен быть конечный запас прочности.

Пытаться испытывать это явление на прочность, что, по сути дела, и происходит в настоящее время в условиях все возрастающего загрязнения окружающей среды

радиоактивными изотопами и химическими мутагенами [15], является чистейшим безумием. Последствия такого «эксперимента» могут быть поистине чудовищными. Первыми предостережениями служат генетические последствия атомных бомбардировок Нагасаки и Хиросимы и начавшееся на наших глазах вымирание нескольких сотен видов животных. Не исключено, что своим достаточно хорошим здоровьем (несмотря на загрязнение окружающей среды) современные поколения молодых людей в значительной степени обязаны также и существованию обсуждаемого здесь явления элиминации ДНК при образовании гамет.

## 5. ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. С применением цитохимического, цитофотометрического и морфологического методов исследования обнаружено, что уменьшение в два раза связывания основных красителей ядрами зрелых сперматозоидов млекопитающих по сравнению с ожидаемым для гаплоидных ядер – не артефакт цитохимического выявления ДНК по методу Фельгена и последующего цитофотометрического анализа ДНК, а результат элиминации половины количества ДНК из ядер молодых сперматид в процессе их превращения в ядра зрелых сперматозоидов.

2. С применением морфологического и цитофлуориметрического методов исследования обнаружено, что у представителей классов птиц, пресмыкающихся, земноводных, рыб, моллюсков и насекомых в результате делений мейоза из сперматоцита I-ого порядка образуется не четыре, а только два гаплоидных сперматозоида, при этом половина количества ДНК, содержащегося в ядре сперматоцита I-ого порядка, элиминируется.

3. Элиминация половины количества ДНК, содержащегося в ядре сперматоцита I-ого порядка, в процессе спермиогенеза у животных, по-видимому, свидетельствует о существовании презиготной селекции, то есть отбора на уровне гамет.

Возможно также, что элиминация  $3/4$  и  $1/2$  ДНК при образовании половых клеток – основная причина возврата сортов растений и пород животных к дикому типу при неблагоприятных условиях среды обитания. Не исключено, что это имеет место и в случае *Homo sapiens*.

4. На примере *Vas. megaterium* показано, что элиминация половины количества ДНК имеет место и при смене ядерных форм у прокариотов.

5. Обнаруженное явление элиминации половины количества ДНК, содержащегося в ядре сперматоцита I-ого порядка, в процессе спермиогенеза у животных и известные в биологии факты свидетельствуют о том, что явление элиминации значительной части ДНК при смене ядерных форм в жизненном цикле развития организмов – явление универсальное, которое возникло в процессе эволюции как приспособление для сохранения биологических видов.

6. Как всякий приспособительный признак, явление элиминации значительной части ДНК при смене ядерных форм в жизненном цикле развития организмов имеет конечный запас прочности, и пренебрегать этим обстоятельством – значит подвергать риску само существование отдельных биологических видов, в том числе и человека.

## 6. ЛИТЕРАТУРА

1. Агроскин Л. С. Бродский В. Я. и Папаян Г. В. 1976. Стандарт в цитофотометрии. Цитология, т. 18, № 4, с. 513-521.

2. Барский И. Я., Хавкин Т. Н., 1968. Фотографический способ микрофлуориметрии при иммунолюминесцентных исследованиях. Цитология, т. 10, № 11, с. 1501-1503.

3. Браше Ж. Биохимическая эмбриология. 1961 Изд.иностр. лит. М.

4. Буш Г. 1967. Гистоны и другие ядерные белки. Изд. «Мир». М.

5. Вилли К. 1959. Биология. Изд. иностр. лит. М.

6. Вильсон Ж. 1936. Клетка и её роль в развитии и наследственности, Том I. Гос. изд. биол. и мед. лит. М.–Л.

7. Гартман М. 1936. Общая биология (введение в



учение о жизни). Гос. изд. биол. и мед. лит. М.– Л.

8. Гольдфарб Д. М. 1966. Введение в генетику бактерий. Изд. «Наука». М.

9. Гродзенский Д. Э. 1966. Радиобиология (Биологическое действие ионизирующих излучений). Атомиздат. М.

10. Данилова Л. В., Захидов С. Т. и Лебедев Э. А. 1976. Цитофотометрическое исследование содержания ДНК в ядрах сперматогенных клеток диплоидов и полиплоидов тутового шелкопряда. Цитология, т. 18, № 4, с. 430–437.

11. Дейч А. 1969. Цитофотометрия нуклеиновых кислот. В кн.: Введение в количественную цитохимию, с. 265–287. Изд. «Мир». М.

12. Де Робертис Э., Новинский В., Саэс Ф. 1973. Биология клетки. Изд. «Мир». М.

13. Дубинин Н. П., Шевченко В. А., Алексеенок А. Я., Черезанова Л. В., Тищенко Е. М. 1972. О генетических процессах в популяциях, подвергающихся хроническому воздействию ионизирующей радиации. В сб.: Успехи современной генетики, том 4, с. 170–205. Изд. «Наука», М.

14. Дубинин Н. П. 1976. Общая генетика. Изд. «Наука». М.

15. Дубинин Н. П., Пашин Ю. В. 1977. Мутагены окружающей среды. Изд. «Знание». М.

16. Дэвидсон Дж. 1968. Биохимия нуклеиновых кислот. Изд. «Мир». М.

17. Дэвидсон Э. 1972. Действие генов в раннем развитии. Изд. «Мир». М.

18. Заварзин А. А. 1938. Курс гистологии и микроскопической анатомии. Медгиз. Л.

19. Зандриттер В. 1969. Методы и результаты количественных цитохимических исследований. В кн.: Введение в количественную цитохимию, с. 139–154. Изд. «Мир». М.

20. Зандриттер В., Кифер Г., Рик В. 1969. Галлоцианин-хромовые квасцы. В кн.: Введение в количественную цитохимию, с. 240–264. Изд. «Мир». М.
21. Зеленин А. В., Куц А. А., Толмачёв В. С. Чебану Ф. А. 1976. Повышенная чувствительность дезоксирибонуклеопротеидов раковых клеток к кислотному гидролизу в реакции Фельгена. ДАН СССР, т. 230, № 3, с. 709–711.
22. Кезер Дж. 1966. Мейоз в сперматоцитах саламандр. Приложение к гл. 7 в книге: Сталь Ф. 1966. Механизмы наследственности, с. 148–165. Изд. «Мир». М.
23. Кикнадзе И. И., Высоцкая Л. В. 1975. Микроскопическая морфология мейоза и его модификаций. В кн.: «Цитология и генетика мейоза». Изд. «Наука». М. с. 15–41.
24. Клишов А. А. 1968. Краткий цитологический словарь. Изд. «Медицина». Л.
25. Куц А. А., Колесников В. А., Ниязатов А. А., Толмачев В. С. и Зеленин А. В. 1976. Количественное цитохимическое исследование хроматина гепатоцитов мыши в ранние сроки после частичной гепатэктомии. Цитология, т. 18, № 4, с. 490–493.
26. Ландау-Тылкина С. П. 1974. Радиация и жизнь. Атомиздат. М.
27. Лилли Р. 1969. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. Изд. «Мир». М.
28. Лобашев М. Е. 1967. Генетика. Изд. ЛГУ.
29. Ляпунова Н. А., Богданов Ю. Ф. 1975. Физиология, цитохимия и биохимия мейоза. В кн.: «Цитология и генетика мейоза». С. 138–183. Изд. «Наука». М.
30. Магешвари П. 1954. Эмбриология покрытосеменных. Изд. иностр. лит. М.
31. Маркерт К., Уршпрунг Г. 1973. Генетика развития. Изд. «Мир». М.
32. Маршак Т. Л., Бродский В. Я. и Урываева И. В. 1970. Влияние свойств ДНП и условий проведения

гидролиза на интенсивность окрашивания при реакции Фельгена. Онтогенез, т. I, № 4, с. 421–428.

33. Микулин В. П. 1972. Фотографический рецептурный справочник. Изд. «Искусство». М.

34. Морган Т. Г. 1937. Развитие и наследственность. Биомедгиз. М.–Л.

35. Навашин М. С. 1936. Методика цитологического исследования. М.

36. Натали В. Ф. 1975. Зоология беспозвоночных. «Просвещение». М.

37. Поддубная-Арнольди В. А. 1976. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. Изд. «Наука». М.

38. Прокофьева-Бельговская А. А. 1969 Мейоз. В кн.: «Основы цитогенетики человека», с. 144–175. Изд. «Медицина». М.

39. Равен Х. 1964. Оогенез (Накопление морфогенетической информации). Изд. «Мир». М.

40. Ригер Р., Михаэлис А. 1967. Генетический и цитогенетический словарь. Изд. «Колос». М.

41. Роскин Г. И. и Левинсон Л. Б. 1957. Микроскопическая техника. Изд. «Сов. наука». М.

42. Рух Ф. 1969. Определение содержания ДНК методом микрофлуориметрии. В кн.: «Введение в количественную цитохимию», с. 229–239. Изд. «Мир». М.

43. Соколов И. И. 1966. Цитологические основы полового размножения многоклеточных животных. В кн.: «Руководство по цитологии», том II. с. 390–460. Изд. «Наука». М.–Л.

44. Сталь Ф. 1966. Механизмы наследственности. Изд. «Мир». М.

45. Суонсон К., Мерц Т., Янг У. 1969. Цитогенетика. Изд. «Мир». М.

46. Сухарева-Немакова Н. Н. и Хачатуров Е. Н. 1969. Люминесцентно-цитохимическое исследование ДНК-содержащих органоидов *Strigomonas oncopelti*. Цитология,

т. 11, № 9, с. 1105–1111.

47. Терци М. 1977. Генетика и животная клетка. Изд. «Мир». М.

48. Токин Б. П. 1977. Общая эмбриология. Изд. «Высшая школа». М.

49. Фриц-Ниггли Х. 1961. Радиобиология, её основы и достижения. Госатомиздат. М., с. 293–294.

50. Хачатуров Е. Н. и Смирнова Е. А. 1966. Применение риванола-S02 для цитофлуориметрии ДНК. Изв. АН СССР, сер. биол., т. 6, с. 900–904.

51. Хачатуров Е. Н. 1968. Люминесцентные методы избирательного выявления РНК в клетках различных типов с помощью реакции Шиффа. Изв. АН СССР, сер. биол., т. 3, с. 353–362.

52. Хачатуров Е. Н. 1968. Модификация и разработка люминесцентно-цитохимических методов исследования нуклеиновых кислот. Канд. дис. Новосибирск.

53. Хачатуров Е. Н. и Сухарева-Немакова Н. Н. 1970. Сравнительное цитохимическое исследование митохондрий и кинетопластов представителей сем. *Trypanosomidae*. Цитология, т. 12, № 1, с. 77–84.

54. Хачатуров Е. Н., 1974. Метод предотвращения выцветания люминесценции клеточных структур при цитофлуориметрическом исследовании нуклеиновых кислот. Изв. АН СССР, сер. биол., т. 2, с. 300–304.

55. Хачатуров Е. Н., Барский В. Е., Галкина И. Г., Стонова Н. С., Максимальдо Ю. Б. 1975. Цитохимическое изучение субстрата, ответственного за дифференциальную окрашиваемость хромосом человека по длине. Изв. АН СССР, сер. биол., 6, 873–880.

56. Хачатуров Е. Н. 1977. Источники некоторых ошибок при цитофлуориметрии ДНК. Онтогенез, т. 8, № 2, с. 205–208.

57. Хачатуров Е. Н. 1980. Цитохимический метод выявления ДНК, основанный на восстановлении

металлического серебра из раствора аммиаката серебра альдегидными группами апуриновой ДНК. Изв. АН СССР, сер. биол., т. 3, с. 362–369.

58. Хачатуров Е. Н. 1980. Применение реакции восстановления серебра из раствора аммиаката серебра альдегидными группами апуриновой ДНК для изучения химизма нуклеального окрашивания по методу Фельгена. Изв. АН СССР, сер. биол., т. 5, с. 678–683.

59. Шевченко В. А., Шиленко Б. В. 1969. О генетических последствиях действия радиации на популяции. В кн.: Современные проблемы радиационной генетики, с. 329–349. Атомиздат. М.

60. Шкорбатов Г. Л. 1976. Вид в природе и в науке. Изв. «Вища школа». Харьков.

61. Baker J. R. 1958. Principles of biological microtechnique (A study of fixation and dyeing). London.

62. Barlow P., Vosa C. G. 1970 The y Chromosome in Human Spermatozoa. Nature, v. 226, N 5249, p. 961–962.

63. Brown S. W. and Nur U. 1964. Heterochromatic Chromosomes in the Coccids (The process of heterochromatization and the function of heterochromatin in coccid insects are reviewed). Science, v. 145, N 3628, p. 130–136.

64. Clermont Y. 1972. Kinetics of Spermatogenesis in mammals: Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonial Renewal. Physiological Reviews, v. 52, N 1, p. 198–236.

65. Church R. R., Mc Carthy B. J. 1967. Ribonucleic acid synthesis in regenerating and embryonic liver. Y. Mol. Biol., v. 23, p. 459–475

66. Gledhill B. L. 1966. «Studies on the DNA content, Nuclear Protein, and Dry Mass of Bull Spermatids and Spermatozoal Heads with Aspects on Fertility», p. 12. Balder, Stockholm.

67. Gledhill B. L., Gledhill M. P., Rigler R. Jr. and Ringertz N. R. 1966a. Changes in deoxyribonucleoprotein

during spermiogenesis in the bull. *Exptl. Cell Res.*, v. 41, p. 652–665.

68. Gledhill B. L., Gledhill M. P., Rigler R. Jr. and Ringertz N. R. 1966b. Atypical changes of deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis associated with a case of infertility in the bull. *J. Reprod. Fertility*, v. 12, p. 575–578.

69. Gledhill B. L. 1970. Changes in nuclear stainability associated with spermateliosis, spermatozoal maturation, and male infertility. In: «Introduction to Quantitative Cytochemistry–II. p. 125–151. N. Y. London.

70. Gledhill B. L. and Campbel G. L. 1973. Microfluorimetric comparizon of chromatin during cytodifferentiation. In: «Fluorescence Techniques in Cell Biology». p.151–162. S.–V. Berlin. Heidelberg. N. Y.

71. Eberle P. 1966. Die Chromosomenstruktur des Menschen in Mitosis und Meiosis. Jena.

72. Fawcett D. W. 1961. Intercellular bridges. *Exptl. Cell Res.*, suppl. 8 p. 174–187.

73. Leuchtenberger C, Schrader F., Weir D. R. and Gentile D. P. 1953. The dcoxyribose nucleic acud (DNA) content in spermatozoa of fertile and infertile human males. *Chromosoma*, v. 6, p. 6i–78.

74. Leuchtenberger C, Leuchtenberger R., Shradler F. and Weir D. R. 1956. Reduced amounts deoxyribose nucleic acid in testicular germ cell of infertile men with active spermatogenesis. *Uib. Invest.*, v. 5, p. 422–440.

75. Leuchtenberger C, Murmanis L., Ito S. and Weir D. R. 1956. Interferometric dry mass and microspectrophotometrik arginine determinations on bull sperm nuclei with normal and abnormal DNA content. *Chromosoma*, v. 8, p. 73–86.

76. Makino S. 1951. An Atlas of the Chromosome Numbers In Animals. Second Edition (First American Edition). Ames, Iowa.

77. Moorhead P. S., Novell P. C, Melman W. J., Battips D. M. and Hungerford D. A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exptl. Cell Res.*, v. 20, p. 613–616.

78. Ryter A. 1965. Etude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Ann. inst. Pasteur*, v. 108, N 1, p.52–60.

79. Sasaki M. and Makino S. 1965. The meiotic chromosomes of man. *Chromosoma (Berl.)*, v. 16, p. 637–651.

80. Sud B. N. 1961. The «Chromatoid Body» in Spermatogenesis. *Quart. MJ. Microscopical Sci.*, v. 102, N 2, p. 273–292.

81. Walker P., Richards B. 1959. Quantitative Microscopical Techniques for single Cells. In: «The Cell», vol. I, p. 91–138. N. Y. London.

82. Wilkins M. H. A., Randal J. T. 1953. Crystallinity in sperm heads: Molecular structure of nucleoprotein in vivo. *Biochim. biophys. Acta*, v. 10, p. 192.

83. Zelenin A. V., Kusch A. A and Chebanu T. A. 1977. Peculiarities of cancer ceils as revealed by study of deoxyribonucleoprotein suscep-tibility to Feulgen hydrolysis. *J Histochem. a Cytochem.*, v. 25, N 7, p. 580–584.

84. Zimmering S., Sandler L., Nicoletti B. 1970. Mechanisms of meiotic drive. *Ann. Rev Genetics*, v. 4 p. 409–436.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

От автора .....	4
Введение .....	7
1. Цитохимические и цитотометрические исследования .....	11
2. Морфологические и цитофлуориметрические исследования .....	34
ТИП – ХОРДОВЫЕ	
1. Класс – Млекопитающие	
а). Бык ( <i>Bos taurus</i> ) .....	53
б). Морская свинка ( <i>Cavia cobaya</i> ) .....	60
в). Мышь ( <i>Mus musculus</i> ) .....	65
г). Человек ( <i>Homo sapiens</i> ) .....	75
2. Класс – Птицы	
д). Петух ( <i>Gallus domesticus</i> ) .....	83
е). Голубь ( <i>Columba livia</i> ) .....	87
3. Класс – Пресмыкающиеся	
ж). Уж обыкновенный ( <i>Natrix natrix</i> ) .....	92
з). Черепаха степная среднеазиатская ( <i>Testudo horsfieldi</i> ) .....	98
4. Класс – Земноводные	
и). Лягушка травяная ( <i>Rana temporaria</i> ) .....	101
к). Лягушка озёрная ( <i>Rana ridibunda</i> ) .....	107
л). Жаба зелёная ( <i>Bufo viridis</i> ) .....	112
5. Класс – Рыбы	
м). Вьюн ( <i>Misgurnus fossilis</i> ) .....	117
н). Сом ( <i>Silurus glanis</i> ) .....	122
ТИП – МОЛЛЮСКИ	
6. Класс – Пластинчатожаберные моллюски	
о). Беззубка ( <i>Anodonia mutabilis</i> ) .....	125
ТИП – ЧЛЕНИСТОНОГИЕ	
Класс – Насекомые	
п). Конёк бурый ( <i>Chonhippus apricarius</i> ) .....	130



р). Стрекоза желтоватая ( <i>Sumpetrum flaveolum</i> ) .....	149
3. Обсуждение результатов, некоторые дополнительные замечания и наблюдения	
1. Методические вопросы .....	154
2. Универсальность явления элиминации значительной части ДНК при смене ядерных форм в жизненном цикле развития организмов и возможная биологическая роль этого явления...	157
4. Области научного и практического использования обнаруженного явления .....	171
5. Основные выводы .....	174
6. Литература .....	175

---

## ЭНЦИКЛОПЕДИЯ РУССКОЙ МЫСЛИ. ТОМ 6

Хачатуров Евгений Николаевич

### ЭЛИМИНАЦИЯ ЗНАЧИТЕЛЬНОЙ ЧАСТИ ДНК ПРИ СМЕНЕ ЯДЕРНЫХ ФОРМ В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ РАЗВИТИЯ ОРГАНИЗМОВ (Научное издание)

Издательство Русского Физического Общества  
«Общественная польза»: 141002, Моск. обл., г. Мытищи,  
ул. Б. Шараповская, 3.  
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать офсетная. Усл.  
печ. л. 12. Тираж 1000 экз. Цена свободная. Заказ № 52.

Типография ЦНИИЭП жилища. Москва