

Е. Ф. ПАВЛОВ, К. С. АБРАМЯН, Н. П. МКРТЧЯН

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ ГОЛОВОК СПЕРМАТОЗОИДОВ ПТИЦ, РЕПТИЛИЙ И АМФИБИЙ В СВЯЗИ С ЕГО ОПОРНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Рассматривая в плане сравнительной цитологии значение скелетных образований в животных клетках и придавая этому вопросу важный общебиологический смысл, Заварзин [1] отмечал слабую его разработанность. Желая подчеркнуть особую важность вопроса существования клеточных скелетных образований, он приводил слова Кольцова: «Если можно говорить о сравнительной цитологии, то в этой науке главной... в течение долгого времени будет сравнительная морфология клеточного скелета». Однако до сих пор этот вопрос не нашел должного отражения в литературе.

Еще в 1909 году, избрав в качестве объектов исследования сперматозоиды с линейно вытянутой головкой, Кольцов пришел к заключению, что роль скелетных образований головки спермия осуществляется цитоплазматическими фибриллами, образующими спираль вокруг ядерной субстанции.

В последнее время несколько иначе к этому вопросу подошел Студитский с сотрудниками [2]. Учитывая большой полиморфизм сперматозоидов, и их головок в частности, он показал на примере морфологически сложно организованного ядра головки сперматозоида речного рака наличие опорной структуры, состоящей из фелъген-позитивного материала. Это наблюдение указывает на возможное наличие определенной связи между структурой хроматина и механическими функциями, выполняемыми головкой сперматозоида в процессе движения последнего. Наиболее четко наличие подобной связи должно выступить у линейно вытянутых головок спермиев, которые, по-видимому, в механическом отношении должны отвечать двум требованиям—сохранять определенную степень жесткости при поступательном движении в жидкой среде и одновременно обладать достаточной эластичностью, необходимой для изменения направления движения сперматозоида. Линейно вытянутые головки спермиев широко представлены среди позвоночных животных в классах амфибий, рептилий и птиц. Головки сперматозоидов некоторых представителей названных классов животных и явились предметом изучения в отношении распределения в них хроматина в связи с возможной опорной функцией последнего.

Исследования проводились на мазках спермы различных животных, окрашенных по Фельгену, гематоксилин-эозином и азаном. Для детального анализа тонких структур мы прибегли к электронной микроскопии ультратонких срезов, сделанных с головок сперматозоидов петухов.

В качестве представителей класса амфибий были использованы два вида животных: озерная и закавказская лягушки (*Rana ridibunda* Pall., *Rana caucagani* Boul.). Учитывая большое сходство морфологических картин распределения хроматина в головках сперматозоидов обоих видов, мы сочли возможным ограничиться описанием структуры фельген-положительного материала только в ядрах спермиев озерной лягушки.

При исследовании мазков, содержащих сперматозоиды указанного вида лягушки, окрашенных по Фельгену, удается выделить два типа распределения хроматина. Первый из них может быть отнесен к типу, характерному для большинства соматических клеток, и представляется в виде хроматиновой сети, распределяющейся по всему ядру. Она включает в себя отдельные гранулы хроматина различной величины, располагающиеся преимущественно по периферии ядра.

Наряду с этим типом постоянно встречается и другой, характеризующийся наличием интенсивно окрашенного спиралевидного образования, насчитывающего от двух до семи витков. Иногда спираль имеет прерывистый вид и как бы состоит из нескольких спирально закрученных отрезков. Они локализуются как в средней части головки, так и по полюсам ее, в некоторых случаях располагаются по всей продольной оси ядра. Общий вид распределения хроматина в ядрах сперматозоидов лягушки представлен на рис. 1а.

В отличие от представителей класса амфибий, у животных, относящихся к рептилиям, распределение фельген-положительного материала в ядрах головок сперматозоидов носит иной характер. Так, у исследованных двух видов черепах—сухупутной и болотной (*Testudo graeca* Gm., *Stemmys caspica* Gm.)—в ядрах головок сперматозоидов, представляющих собой подобие вытянутого конуса, хроматин распределяется в виде отдельных, четко отграниченных глыбок, разделенных друг от друга оптически пустыми промежутками. Эта картина наблюдается не только при использовании окраски по Фельгену, но и при окрашивании препаратов гематоксилин-эозином и азаном. Правда, при применении последних двух красителей описанная картина получается менее четкой.

Поскольку у рассматриваемых объектов хроматиновые глыбки оказываются хорошо обособленными друг от друга, а головки сперматозоидов в мазках располагаются в одной плоскости, нам представилось возможным провести подсчет фельген-положительных образований в отдельных головках. Подсчет числа хроматиновых глыбок, приходящихся на одно ядро, был проведен в 1000 головок сперматозоидов на 20 мазках спермы сухупутной черепахи. Обработка полученного цифрового материала показала, что на одно ядро в среднем приходится примерно 7 глыбок (при колебаниях в пределах от 4 до 12). Общий вид распределения хроматина в ядрах сперматозоидов сухупутной черепахи представлен на рис. 1б.

Следующая группа изученных объектов состояла из представителей трех таксономически различных групп птиц. Наибольшее число видов, у которых были получены препараты сперматозоидов, относилось к ку-



Рис. 1. Распределение хроматина в ядрах головок спермиев: а) озерной лягушки, б) сухопутной черепахи, в) петуха. Окраска по Фельгену, Об. 90 гомаль 5, ув. 1900 \times .

риным: петухи породы леггорн, цесарки, индейки, фазан кавказский (*Phasianus colchicus* L.). Вторая группа была представлена пластинчатоклювыми: гусь домашний, утка пекинской породы и мускусная утка (*Cairina moschata*). И, наконец, отряд голубиных был представлен одним видом—голубем домашним (*Columba livia* Gm.).

В более сильно вытянутой головке сперматозоидов птиц величина хроматиновых гранул оказывается несколько меньшей, чем в ядрах сперматозоидов черепах, а их количество сильно возрастает. Эта картина особенно характерна для ядер спермия голубя, где практически нитевидная головка, составляющая примерно треть всей длины сперматозоида, содержит мельчайшие гранулы хроматина, слабо выявляемые даже при окраске по Фельгену.

Вторая особенность, отмеченная в распределении хроматина, присущем спермиям петухов, заключается в том, что, наряду с наличием хроматина в виде гранул, в небольшом числе случаев встречаются ядра, хроматин которых располагается в виде непрерывного стержня, по всей длине ядра. Подсчеты показали, что такие сперматозоиды составляют примерно 0,4%.

Наконец (как промежуточный, третий вариант) встречаются сперматозоиды, ядра которых содержат как отдельные гранулы хроматина, так и вытянутые отрезки фельген-положительной субстанции. Количество сперматозоидов этой группы составляет 5,46%, а число гранул достигает в среднем шести.

Необходимо отметить, что такое разнообразие в распределении хроматина характерно только для сперматозоидов петухов, чего у других видов птиц, так же как и у черепах, не удалось наблюдать. Для объяснения этого явления мы обратили внимание на некоторые особенности строения головки сперматозоида петухов и последовательность его формирования в процессе сперматогенеза.

Исследование препаратов семенников, окрашенных по Фельгену, отчетливо показало, что хроматин ядер спермиев, связанных со стенками канальцев, в основном гомогенен и располагается по длине ядра. У небольшого количества сперматозоидов удается отметить начало появления гранул, т. е. наблюдается картина, описанная для промежуточного, третьего типа распределения хроматина. Для ядер спермиев, завершивших спермателиоз, характерно гранулярное распределение хроматина, иными словами, грануляция хроматина является как бы завершающим этапом спермателиоза. Она начинается в ядрах сперматозоидов, еще сохраняющих связь со стенками канальцев семенника, и завершается в ядрах спермиев, свободно лежащих в просветах канальцев. Появление в массе зрелых сперматозоидов небольшого количества (около 6%) незавершивших морфологических преобразований хроматина спермиев может быть объяснено большой интенсивностью спермиогенеза, который у петухов имеет место на протяжении круглого года и протекает очень активно, в то время как у других исследованных нами видов животных он носит сезонный характер и протекает на более низком уровне. След-

ствии этого у петухов часть незрелых сперматозоидов порывает связь со стенками канальцев семенника и оказывается смешанной с массой зрелых спермиев.

Общий вид распределения хроматина в ядрах сперматозоидов петухов представлен на рис. 1в.

При сравнении локализации хроматина в ядрах сперматозоидов всех трех исследованных классов животных можно видеть, что характер его распределения в ядрах сперматозоидов птиц в значительной мере напоминает картину, описанную в отношении черепах.

Вторично наблюдая гранулярное распределение хроматина в ядрах сперматозоидов птиц (первый случай описан для черепахи), мы провели подсчет числа отдельных фельген-положительных образований в ядрах сперматозоидов петухов. Получение таких данных представлялось целесообразным в связи с тем, что в литературе появились сообщения об идентификации с хромосомами фельген-положительных глыбок, расположенных поочередно в ядрах сперматозоидов с сильно вытянутой головкой. О подобном, тандемном, расположении хромосом у трех видов червецов сообщила Хюджес-Шредер в 1946 г., а в отношении сперматозоидов петухов сходные данные были приведены Щербаковым и Лавренчук [4].

Очевидно, что для отождествления хроматиновых глыбок с хромосомами необходимо одно важное условие—совпадение количества глыбок с гаплоидным числом хромосом, характерным для кур. Подсчет числа хроматиновых глыбок, приходящихся на одно ядро, был проведен на 5000 головок сперматозоидов от 5 петухов. Обработка полученного материала показала, что на одно ядро в среднем приходится 13 гранул, при колебаниях в пределах 6—22 гранул. Если учесть, что гаплоидное число хромосом у кур составляет, по Ямашина [5], 39, то заключение о тандемном расположении хромосом в ядрах сперматозоидов петухов не находит подтверждения, так как разрыв между гаплоидным числом хромосом в наборе и даже максимальным числом гранул составляет 17 единиц, что, по-видимому, не может быть отнесено за счет погрешностей методики.

Итак, данные световой микроскопии позволили установить известную морфологическую общность в распределении хроматина у представителей классов рептилий и птиц, но остался открытым вопрос о функциональном значении гранулярного распределения хроматина в ядрах сперматозоидов, так как попытка связать эту структуру с гаплоидным числом хромосом оказалась несостоятельной.

Для получения дополнительных данных о тонкой структуре хроматина в ядрах сперматозоидов исследованных видов животных естественно было прибегнуть к электронной микроскопии.

Для электронномикроскопического исследования были использованы сперматозоиды петуха, обработанные следующим образом. Невысушенные мазки спермы фиксировали по Паладе и после быстрого обезвоживания заливали в смесь метакрилатов в форме плоско-параллельной заливки. Этот метод позволил получить в большом количестве

максимальные сечения с головок сперматозоидов. Ультратонкие срезы готовили при помощи ультрамикротомов ЛКБ 4800 А и УМТП-2; после контрастирования уранилацетатом, а также цитратом свинца, по Рейнольдсу, срезы изучали и фотографировали в электронном микроскопе BS 413 А при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличениях 10000, 15000, 25000 и 39000 х.

Косопродольные ультратонкие срезы через головки сперматозоидов показали существование трех различных картин распределения хроматина в ядрах. В наибольшем количестве препаратов хроматин представлен в виде иксообразных или параллельных структур, разобщенных между собой и расположенных почти перпендикулярно к продольной оси ядра. Этот тип распределения, по-видимому, можно связать с гранулярным строением хроматиновых структур, характерных для зрелых сперматозоидов и описанных выше на основе данных световой микроскопии. Распределение хроматина для данного случая представлено на рис. 2 а, б.

Довольно часто встречается и другой вариант—спиралевидное распределение хроматина. В этом случае хроматиновый тяж в виде спирали обвивает основную массу кариоплазмы. Такая структура также не противоречит гранулярной организации хроматина, наблюдаемой в световом микроскопе, т. к. отдельные витки спирали вполне могут соответствовать одиночным гранулам. Спиралевидное распределение хроматина в ядре сперматозоида петуха представлено на рисунке 2 в, г.

Третий вариант наблюдающегося распределения хроматина встречается редко: хроматин расположен в виде стержня, вытянутого по длинной оси ядра, который местами отчетливо проявляет тенденцию к спирализации, однако высота отдельных витков остается еще значительно меньшей, чем это имеет место в двух предыдущих случаях. Подобную организацию хроматина уже невозможно увязать с картиной гранулярного его распределения, наблюдаемой в световом микроскопе, но она идентична структуре, присущей молодым формам спермиев, встречающимся в семенных канальцах (описанных выше), а также в небольших количествах в мазках зрелой спермы. Распределение хроматина на начальной стадии спирализации представлено на рис. 2 д, е.

Итак, если сопоставить картины распределения хроматина в ядрах зрелых и завершающих спермателиоз сперматозоидов амфибий, рептилий и птиц, наблюдаемые в световом микроскопе, с данными электронной микроскопии в отношении распределения хроматина в ядрах сперматозоидов петухов, можно прийти к заключению, что для представителей названных классов (сперматозоиды которых характеризуются сильно вытянутой линейной головкой) типична спиралевидная форма хроматина. В процессе образования спермиев она появляется на заключительном этапе спермателиоза. Образованию спирали предшествует перегруппировка хроматина из рыхлой сетчато-гранулярной формы, присущей сперматидам, в компактную стержневидную структуру, располагающуюся по длинной оси ядра, которая служит отправной точкой для образования спирали.

В сравнительно-эволюционном аспекте, по-видимому, можно говорить о том, что спирализация хроматина у позвоночных появляется параллельно с возникновением сперматозоидов с сильно вытянутыми го-

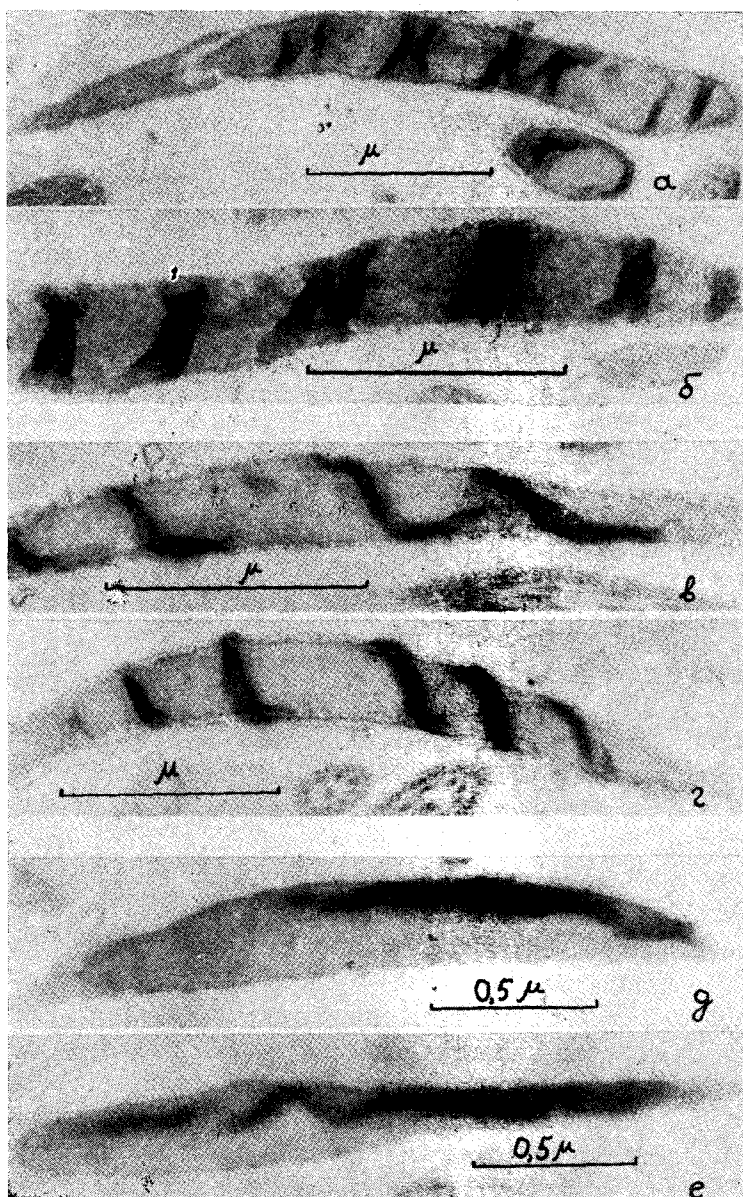


Рис. 2. Распределение хроматина в ядре сперматозоида петуха: а, б) иксообразное, ув. 31500 \times и 45000 \times . в, г) спиралевидное, ув. 45000 \times . д, е) в ядре незрелого сперматозоида отчетливо видно начало образования хроматиновой спирали, ув. 57000 \times .

ловками и морфологически может быть прослежена уже у амфибий. Здесь она носит еще незавершенный характер, т. к. наряду со спиралью,

проходящей по всей длине ядра, спиралевидные образования хроматина встречаются в виде отдельных фрагментов. У рептилий спирализация завершается и в таком завершенном виде оказывается широко представленной у птиц.

Представляется весьма вероятным, что скелетные протоплазматические структуры, описанные Кольцовым [3] еще в девятисотых годах для сперматозоидов петухов, являются аналогами рассмотренных в настоящем сообщении хроматиновых спиралей, которые в то время не удалось идентифицировать с ядерным субстратом из-за отсутствия специфической окраски хроматина.

Естественно возникает вопрос о функциональном значении описанной выше перестройки хроматина на завершающих стадиях спермиогенеза.

Морфологические особенности строения сперматозоидов исследованных животных, а именно сильно вытянутая форма головки, приводит к мысли о том, что в механическом отношении они должны отвечать двум требованиям: обладать определенной жесткостью и одновременно эластичностью, необходимой для поступательного движения. Эти качества, по-видимому, наилучшим образом проявляются при наличии опорной структуры в виде спирали.

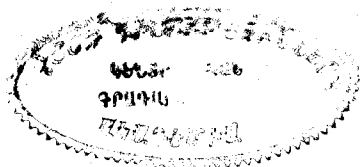
Спиралевидная структура, образованная фельген-положительным материалом ядер сперматозоидов, вероятно, является наиболее приемлемой формой осуществления его основных функций, так как не противоречит условиям хранения и передачи информации и наиболее совершенно позволяет осуществить опорную функцию, по-видимому, необходимую спермиям с сильно вытянутыми головками.

Вместе с тем, появление компактной спиралевидной структуры хроматина в ядрах сперматозоидов с линейными головками предполагает еще наличие одной перестройки фельген-положительного материала после проникновения сперматозоида в яйцеклетку. Такая перестройка должна приводить к восстановлению сетчато-гранулярной структуры хроматина, характерной для подавляющего большинства клеток, в период образования мужского пронуклеуса, т. е. незадолго до превращения двух родительских гамет в одну зиготу.

Таким образом, мысль, высказанная Студитским с сотрудниками [2] о возможности осуществления дезоксирибонуклеопротеидами сперматозоидов речного рака, наряду с основной, и опорной функции, имеет более общее значение и вполне может быть приложима к рассмотренным нами случаям.

Институт зоологии АН АрмССР,
Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 12.V 1970 г.



Ե. Յ. ՊԱՎԼՈՎ, Կ. Ս. ԱԲՐԱՆՉՈՒՄՅԱՆ, Ն. Պ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ

**ՔՐՈՄՍՈՏԻՆԻ ԲԱՇՇԵՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԹՈՉՈՒՆՆԵՐԻ,
ՍՈՂՈՒՆՆԵՐԻ ԵՎ ԵՐԿԿԵՆՅԱՂՆԵՐԻ ՍՊԵՐՄՍՏՈՉՈՒԳՆԵՐԻ ԳԼԽԿԿՆԵՐԻ
ՄԵԶ՝ ԿԱՊՎԱԾ ՆՐԱ ՀԵՆԱՐԱՆԱՅԻՆ ՖՈՒՆԿՅՈՒՅԻ ՀՆՏ**

Ա մ փ ո փ ու մ

Թռչունների, սողունների և երկկենցաղների սպերմատոզոիդների զծային ձգված գլխիկների օրինակի վրա լուսային և էլեկտրոնային մանրադիտության օգնությամբ որոշվել է քրոմատինի պարուրածև կառուցվածքը:

Համեմատական-էվոլյուցիոն տեսակետից այդ կառուցվածքի առաջացումը նկատվում է սկսած երկկենցաղներից: Էլեկտրոնային մանրադիտության տվյալների համաձայն հայտնաբերված կառուցվածքները, ըստ աքաղաղի սերմի օրինակի, հավանորեն կատարում են կմախքային-հենարանային գոյացումների ֆունկցիա:

Քրոմատինային կառուցվածքների պարուրավորման պրոցեսը հաջողվել է հետևել տարբեր աստիճանի հասունացման սպերմատոզոիդների վրա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Заварзин А. А. Избранные труды, т. IV, М.—Л., 1953.
2. Студитский А. Н., Елякова Г. В., Булякова Н. В. Структура и функции клеточного ядра, М., 1967.
3. Кольцов Н. К. цит. по Вильсону. Клетка и ее роль в развитии и наследственности, т. I, М.—Л., 1936.
4. Щербачев Е. С., Лавренчук В. Я. Генетика, 4, 2, 117, 1968.
5. Yamashina M. V. Karyotype studies in birds I Comparative morphology of chromosomes in seventeen races of domestic fowl. Cytologia 13:270—296, 1944.