

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК И РНК В ЯДРАХ
ПОКРОВНЫХ ТКАНЕЙ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ СКРЕБНЕЙ

В. Н. Барабашова

Научно-исследовательский институт биологии
Харьковского государственного университета

Исследовано распределение ДНК и РНК в ядрах покровных тканей четырех видов скребней (*Macracanthorhynchus hirudinaceus*, *Polymorphus magnus*, *Acanthocephalus ranae*, *A. lucii*). Показано, что ядра гиподермы исследованных видов имеют различный, специфический для каждого вида характер распределения ДНК, что является, по-видимому, систематическим признаком.

Своеобразие, необычная форма и состояние гиподермальных ядер у различных видов скребней были отмечены Гаманном (Hamann, 1894), Мейером (Meuer, 1933, 1938) и другими авторами. Они показали, что в гиподерме скребней имеются 2 типа ядер — первичные гигантские амeboидные ядра, встречающиеся обычно в таком малом количестве, что некоторые области покровных тканей остаются совершенно свободными от ядер, и вторичные ядерные фрагменты, происшедшие от первых путем амитотического деления, вследствие чего создается нормальная плотность распределения ядер в ткани. Наиболее полно исследовал состояние гиподермальных ядер Ван Клив (Van Cleave, 1928, 1951), которому удалось показать, что онтогенетические группы развития гиподермальных ядер у наиболее высоко организованных форм скребней представляют собой поразительно сходную картину с состоянием конечных стадий развития ядер у различных родов, расположенных в филогенетической последовательности. Ядерные формы располагаются здесь в следующем порядке: яйцевидные, розетковидные, амeboидные, удлиненные с боковыми ответвлениями, ветвящиеся древовидные и, наконец, мелкие фрагменты, образовавшиеся в результате амитотического деления ветвящихся форм.

Литературных данных о топографии нуклеиновых кислот в столь своеобразных ядрах покровных тканей скребней мы не нашли, за исключением работы Кромптона (Crompton, 1963), где приводятся сведения о наличии ДНК и РНК в ядрах и ядерных включениях *Polymorphus minutus*, но не указывается характер их расположения. В ядрах кожно-мышечного мешка разных видов нематод, как было показано Богоявленским и Дрыночкиной (1965), ДНК располагается специфично и в неодинаковом количестве. Авторы пришли к выводу, что различная среда обитания не оказывает какого-либо заметного влияния на количество и специфику распределения ДНК, и предполагает, что эта специфика, по-видимому, является в какой-то мере систематическим признаком.

Ввиду неизученности этого вопроса у скребней мы сочли целесообразным исследовать гистохимическими методами в сравнительном аспекте содержание и локализацию ДНК и РНК в ядрах гиподермы некоторых представителей *Acanthocephala*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Были изучены самцы и самки следующих видов скребней: *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (подкл. *Gigantorhynchinea*), *Polymorphus magnus*, *Acanthocephalus ranae* и *A. lucii* (подкл. *Echinorhynchinea*). Материал фиксировали жидкостями Карнуа и Ценкера, заливали в целлоидин-парафин и изготавливали срезы толщиной 5—6 мк.

Для выявления ДНК использовали реакцию Фельгена, для выявления РНК — реакцию Браше. При проведении реакции Фельгена было установлено, что время гидролиза (8—12 мин.), рекомендуемое для низших позвоночных Роскиным и Левинсоном (1957), для скребней недостаточно.

Время гидролиза было подобрано экспериментально. ДНК не выявлялась при гидролизе в течение 5 и 15 мин., слабо выявлялась на препаратах, подвергавшихся гидролизу 30 мин. Оптимальной оказалась экспозиция в 1 час. При увеличении экспозиции интенсивность реакции падала. Аналогичное явление отмечали Богоявленский и Дрыночкина (1965), изучавшие при помощи реакции Фельгена распределение ДНК в ядрах кожно-мускульного мешка нематод и также экспериментально получившие оптимальное время гидролиза, равное 1 часу.

Для реакции Браше мы использовали растворы метилового зеленого и пиронина, изготовленные по прописи Тревана и Шаррока (Пирс, 1962, стр. 745). Раствор А : 17.5 мл 5%-го водного раствора пиронина, 10 мл 2%-го водного раствора метилового зеленого и 250 мл дистиллированной воды. Раствор Б : М/5-ацетатный буфер с рН=4.8. Равные объемы растворов А и Б смешиваются перед употреблением. Срезы окрашивали соответствующей смесью красителей в течение 20 мин. РНК из срезов удаляли обработкой в растворе РНК-азы (1 мг/мл) в течение 2 час. при 37°. С той же целью использовали гидролиз в 1 н. растворе HCl в продолжение 5 мин. при 60° (Меркулов, 1961). В качестве дополнительного контроля проводилась окраска препаратов после выдерживания в бидистилляте 2 часа при 37°. В течение 20 мин. РНК из срезов удаляли обработкой в растворе РНК-азы (1 мг/мл) в течение 2 час. при 37°. С той же целью использовали гидролиз в 1 н. растворе HCl в продолжение 5 мин. при 60° (Меркулов, 1961). В качестве дополнительного контроля проводилась окраска препаратов после выдерживания в бидистилляте 2 часа при 37°.

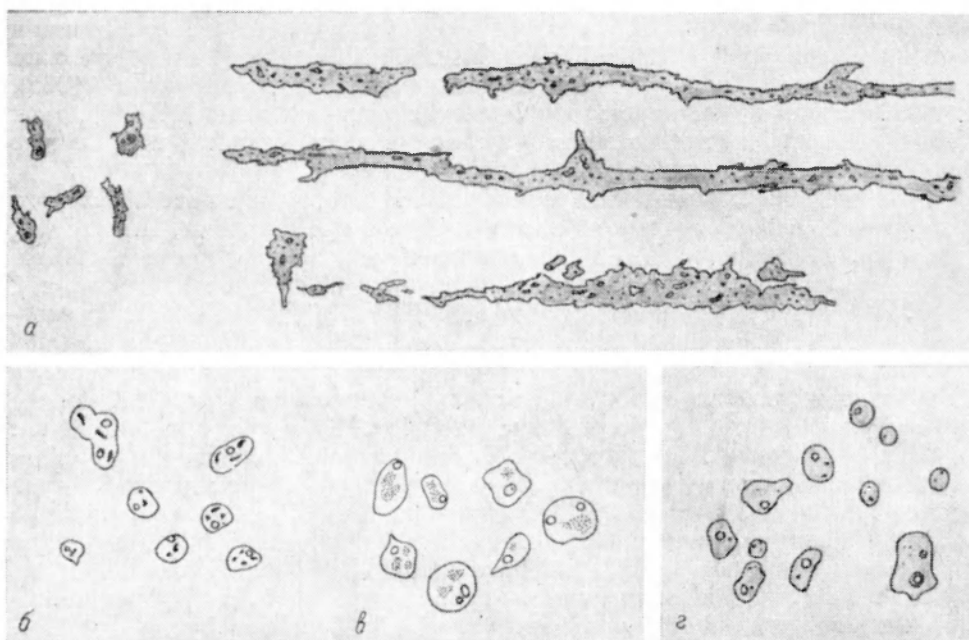
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Macracanthorhynchus hirudinaceus (см. рисунок). Ядра этого вида скребней имеют сильно вытянутую, древовидно разветвленную форму и достигают 3—5 мм длины при поперечнике от 0.030 до 0.060 мм. Они содержат значительное количество ДНК и на срезах, обработанных по Фельгену, окрашиваются в красно-фиолетовый цвет. ДНК локализована здесь весьма своеобразно — она располагается диффузно по всему ядру. Диффузная окраска ядер неравномерная, местами наблюдаются более интенсивно окрашенные участки. Однако какой-либо закономерности в их распределении или приуроченности к определенным частям ядра установить не удалось. Глыбок хроматина нет. В некоторых участках ядер заметна мелкая зернистость. Ядрышек насчитывается более десятка на поперечном срезе ядра и более сотни на продольном. Они часто располагаются в вакуолях и так как на срезах, обработанных по Фельгену, остаются неокрашенными, от вакуолей их можно отличить по большей оптической плотности.

На срезах, окрашенных метиловым зеленым—пиронином ядра гиподермы *M. hirudinaceus* также окрашиваются диффузно метиловым зеленым. Надо отметить, что интенсивность окраски ДНК в ядрах, иногда лежащих рядом на одном срезе, бывает различной как при окраске реактивом Шиффа, так и метиловым зеленым—пиронином. Ядрышки различной формы и величины окрашиваются пиронином в яркий розовый цвет. Они не гомогенны, местами в них наблюдаются сгущения окраски. Боль-

шинство крупных ядрышек располагается в вакуолях; в наиболее крупных из них имеются вакуоли, которые располагаются иногда в центре, иногда выступая по краю ядрышка. Цитоплазматические части покровных тканей также окрашиваются пиронином. РНК в них располагается неравномерно, наиболее интенсивно окрашивается радиально-волокнистый слой, наименее интенсивно — войлочно-волокнистый.

Acanthocephalus ranae. Ядра гиподермы этого вида скребней — вторичные, amitotически фрагментированные, от 0.012 до 0.095 мм в поперечнике. На срезах обработанных по Фельгену, ДНК в них выявляется в виде зернистости, собранной в рыхлые глыбки и в неодинаковом количестве. Встречаются ядра, содержащие маленькое рыхлое «облачко» из мельчай-



Распределение ДНК в ядрах гиподермы.

a — *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (продольные и поперечные срезы, 7×8); б — *Polymorphus magnus* (7×40); в — *Acanthocephalus ranae* (7×40); г — *Acanthocephalus lucii* (7×40).

ших зернышек; ядра с 1—3 небольшими рыхлыми слабо окрашенными глыбками; ядра с 1—2 крупными скоплениями такого же характера, занимающими около половины ядра и, наконец, ядра, почти целиком заполненные рыхлым скоплением слабо окрашенных реактивом Шиффа зернышек, и лишь с небольшой прозрачной каймой по краю, в которой располагается ядрышко. Ядрышек в ядре 1—3, они окрашиваются пиронином в ярко-розовый цвет.

Acanthocephalus lucii. Ядра гиподермы *A. lucii* являются вторичными amitotическими фрагментами и имеют в поперечнике от 0.019 до 0.047 мм. Чрезвычайно слабая фиолетовая окраска ядер по Фельгену не дает возможности установить, распределяется ли ДНК диффузно или в виде мельчайшей пылевидной зернистости по всему ядру. Обработка препаратов *A. lucii* по Браше не проводилась.

Polymorphus magnus. Вторичные amitotически фрагментированные ядра этого вида скребней имеют в поперечнике 0.012—0.095 мм. При применении реакции Фельгена они интенсивно окрашиваются в красно-фиолетовый цвет. ДНК в них располагается в виде компактных, неопределенной формы глыбок в количестве от 1 до 4 на одно ядро. При обработке по Браше ядрышки окрашиваются в розовый цвет. В ядре их от 1 до 3.

Как у вышеописанных видов, так и у *P. magnus* наблюдается резкое отличие в степени пиронинофилии различных слоев покровной ткани и наиболее интенсивно окрашивается радиально-волокнистый слой.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе обработки материала нами было обнаружено, что часто рекомендуемая фиксация жидкостью Ценкера у всех исследованных нами видов вызывает искусственную пиронинофилию ядер. Если ядра гиподермы после фиксации жидкостью Карнуа и обработки по Браше нормально метилофильны, то при окрашивании после фиксации жидкостью Ценкера они приобретают розовый цвет с фиолетовым оттенком. Ядра мускулатуры также становятся пиронинофильными, и синевато-сиреневое окрашивание наблюдается только в ядрах дробящихся яиц. Пятиминутный гидролиз в 1 н. HCl после обоих фиксаторов также вызывает пиронинофилию ядер, причем не только в гиподерме и мышцах, но и в половых клетках и зрелых яйцах.

Конаревым и сотрудниками (1958) при разработке методов оценки содержания и состояния нуклеиновых кислот в растительных клетках было показано, что метилофильные ядра после гидролиза в 1 н. HCl становятся пиронинофильными за счет изменений, происходящих в самом дезоксирибонуклеопротеиде; это сопровождается изменением характера связи ДНК с белком и частичной деполимеризацией ее молекулы. Они отметили также появление искусственной пиронинофилии ядер после фиксации жидкостью Ценкера.

По-видимому, при исследовании скребней мы столкнулись с подобным явлением.

При сравнении полученных данных можно констатировать, что ядра гиподермы 4 исследованных видов скребней имеют различный, специфичный для каждого вида характер распределения ДНК. Особенно интересным фактом является обнаруженное нами у *M. hirudinaceus* диффузное распределение ДНК. Своеобразие распределения ДНК в гиподермальных ядрах этого вида скребней нельзя объяснить неудачной фиксацией или плохо проведенной реакцией Фельгена, так как на тех же препаратах видно, что в ядрах мускульной ткани и половых клеток ДНК располагается не диффузно, а в виде глыбок и зернышек. Его нельзя объяснить также более благоприятными условиями фиксации (Макаров, 1946), поскольку все исследованные нами виды скребней подвергались одинаковой фиксации и последующей обработке. Можно лишь предполагать, что причиной диффузного распределения ДНК без следов каких-либо локальных структур в ядрах гиподермы скребня-великана является ее своеобразное состояние.

Очень слабый положительный результат при окраске ядер гиподермы *Acanthocephalus lucii* реактивом Шиффа не говорит еще о малом количестве ДНК в этих ядрах, возможно, она здесь находится в связанном состоянии.

Различия в коагулирующем действии фиксаторов на хроматин ядер гиподермы отдельных видов скребней могут свидетельствовать косвенным образом о различиях в количестве и качестве ядерных белков. Поэтому специфика морфологического распределения ДНК в ядрах гиподермы скребней так же, как и в ядрах кожно-мускульного мешка нематод (Богоявленский и Дрыночкина, 1965), является, по-видимому, систематическим признаком.

Л и т е р а т у р а

- Александров В. Я. и др. 1965. Руководство по цитологии, т. 1. Изд. «Наука», М.—Л.
- Богоявленский Ю. К. и Дрыночкина З. В. 1965. Сравнительно-гистохимическое изучение ДНК в тканях кожно-мускульного мешка некоторых паразитических нематод. Тр. Гельминтол. лабор. АН СССР, 15 : 55—59.

- К о н а р е в В. Г., З а к и р о в С. Э. и Е л с а к о в а Т. Н. 1958. Пиронинофилия ядра как показатель состояния дезоксирибонуклеиновой кислоты. ДАН СССР, 120 (2) : 409—411.
- К о н а р е в В. Г. 1959. Нуклеиновые кислоты и морфогенез растений. Изд. «Высшая школа», М.
- М а к а р о в П. В. 1946. О распределении тимонуклеиновой кислоты в интеркинетическом ядре. ДАН СССР, 54 (1) : 68—71.
- М е р к у л о в Г. А. 1961. Курс патогистологической техники. Медгиз, Л.
- П и р с Э. 1962. Гистохимия. ИЛ, М.
- Р о с к и н Г. И., Л е в и н с о н Л. Б. 1957. Микроскопическая техника. Изд. «Советская наука», М.
- С r o m p t o n D. W. T. 1963. Morphological and histochemical observations on *Polymorphus minutus* (Goeze, 1782), with special reference to the body wall. Parasitology, 53, № 3—4 : 663—685.
- Н а м а н О. 1891. Monographie der Acanthocephalen (Echinorhynchen). Jen. Zeitschr. Naturwiss., 25 : 113—231.
- М е у е r А. 1933. Acanthocephala. Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreichs, Bd. 4. Abt. 1—2, Buch 2 : 1—582.
- V a n C l e a v e H. J. 1928. Nuclei of the Subcuticula in the Acanthocephala. Z. f. Zelloforsch. u. Mit. Anat., Bd. 7 : 109—113.
- V a n C l e a v e H. J. 1951. Giant nuclei in the subcuticula of the thorny-headed worms of the hog (*Macracanthorhynchus hirudinaceus*). Trans. Amer. Microsc. Soc., 70 (1) : 37—46.

THE DISTRIBUTION OF DNA AND RNA IN NUCLEI OF
INTEGUMENTARY TISSUES IN CERTAIN ACANTHOSEPHALS

V. N. Barabashova

S U M M A R Y

The distribution of DNA and RNA has been studied in nuclei of integumentary tissues of *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (subclass *Gigantorhynchinea*), *Polymorphus magnus*, *Acanthocephalus ranae* and *A. lucii* (subclass *Echinorhynchinea*).

The hypodermal nuclei in these worms are shown to have different types of distribution of DNA, specific for each species. *Macracanthorhynchus hirudinaceus* has been found to have a diffuse type of distribution of DNA. It is supposed that the specificity of the distribution of DNA in hypodermal nuclei is to a certain extent a taxonomic character.
