

УДК 575.16:576.3:577.3:595.787

© 2002 г. Я. Р. БАДРАДИНОВ, В. Г. ШАХБАЗОВ

## ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР В ПРОЦЕССЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ТУТОВОГО *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA: LYMANTRIIDAE) И ДУБОВОГО *ANTHRAEA PERNYI* GUÉRIN (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) ШЕЛКОПРЯДОВ

К настоящему времени процесс сперматогенеза у животных детально изучен с применением цитобioхимических, электронномикроскопических, автордиографических и других методов (Данилова, 1976, 1978; Костомарова, Князева, 1982).

На кафедре генетики и цитологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина ранее было проведено большое количество исследований энергетических характеристик клеточных ядер соматических клеток различных организмов с использованием методики внутриклеточного микроэлектрофореза (Шахбазов, Лобынцева, 1971; Страшнюк, 1988; Шкорбатов, Шахбазов, 1992). Результаты этих исследований позволяют считать электрокинетический потенциал клеточного ядра интегральной характеристикой его функциональной активности в течение индивидуального развития организма.

Предполагается, что динамика изменения зарядов клеточных ядер в онтогенезе во многом обусловлена зарядом, который формируется во время оплодотворения в зиготе (Шахбазов, 1966). Последний в значительной степени зависит от привносимых в зиготу зарядов ядер мужской и женской гамет.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение энергетических характеристик ядер формирующихся мужских половых клеток тутового и дубового шелкопрядов. Такое исследование было проведено впервые.

Полученные данные анализировались в связи с изменением интенсивности дыхания куколок. Известно, что уровень дыхания тесно связан с уровнем интенсивности энергетических процессов в организме (Скулачев, 1969). В работах ряда авторов (Никольская, Грудницкий, 1970; Радзинская, Никольская, 1972) была показана связь между дыханием, энергетическим обменом и функциональной активностью ядра. Известно также о наличии связи между активностью ядра и его биоэлектрическими свойствами (Шкорбатов, Шахбазов, 1982, 1992). Таким образом, выбранный физиологический показатель отчасти характеризует энергетику процессов, происходящих в ядрах формирующихся сперматозоидов.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили куколки тутового шелкопряда породы Белококонная-2 (Б-2) и межпородный гибрид Б-2×Б-1, а также куколки линии I<sub>4</sub> китайского дубового шелкопряда. При температуре инкубации + 24°C развитие куколок тутового и весеннее развитие куколок дубового шелкопрядов длилось 10 суток.

Подсчёт ядер, смещающихся в электрическом поле, проводился с первых суток развития куколок тутового шелкопряда и с нулевых суток развития (сутки извлечения куколок из холодильника после зимовки) дубового шелкопряда до выхода имаго.

Для определения электрокинетических свойств клеточных ядер использовалась методика внутриклеточного микроэлектрофореза, разработанная на кафедре генетики и цитологии ХНУ (Шахбазов, Лобынцева, 1971). Суть метода заключается в электрофорезе пласта клеток и учёте доли (в %) клеточных ядер, смещающихся в электрическом поле. Электрофорез сперматогенных клеток проводили в стандартном физиологическом растворе Эффрусси-Бидла при силе тока в камере 150 мА и напряжении 18 В. Эти величины были подобраны экспериментально на начальных этапах исследования.

Для определения потребления куколками кислорода был использован респирометр с горизонтальным положением манометра, конструкция которого также разработана на кафедре генетики и цитологии ХНУ (Шахбазов, 1964). На дно каждой из камер респирометра вводили по 10 мл 10 %-ного раствора КОН для поглощения углекислого газа. После чего, в камеры на стеклянные сеточки помещали исследуемые объекты. Учёты проводились с интервалом в 30 минут. Объём газа, отсчитанный по капиллярам манометра в см<sup>3</sup>, пересчитывался на 1 г сырого веса объекта за 1 час и приводился к 0°C и к нормальному атмосферному давлению.

**Результаты.** Результаты изучения изменения электрокинетических свойств клеточных ядер представлены на рис. 1–3.

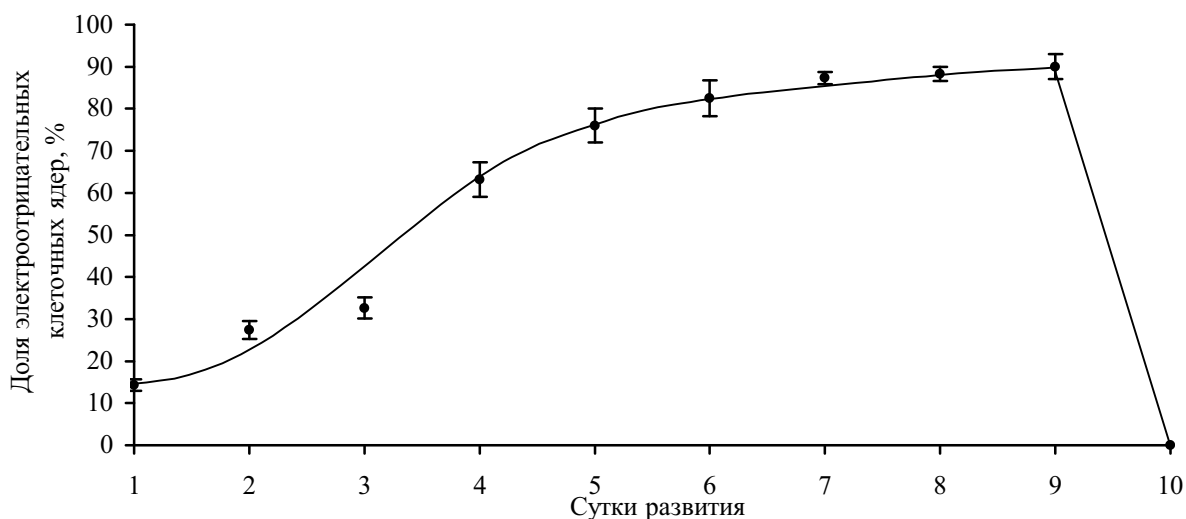


Рис. 1. Изменение электрокинетических свойств ядер сперматогенных клеток в процессе инкубации куколок тутового шелкопряда породы Б-2.

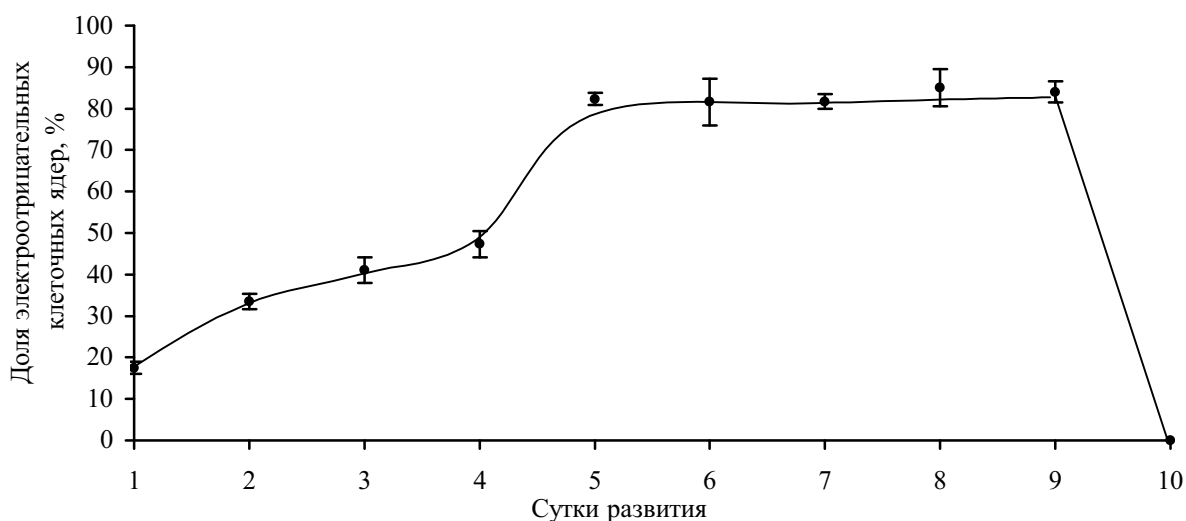


Рис. 2. Изменение электрокинетических свойств ядер гаметоцитов в процессе инкубации куколок гибрида тутового шелкопряда Б-2×Б-1.

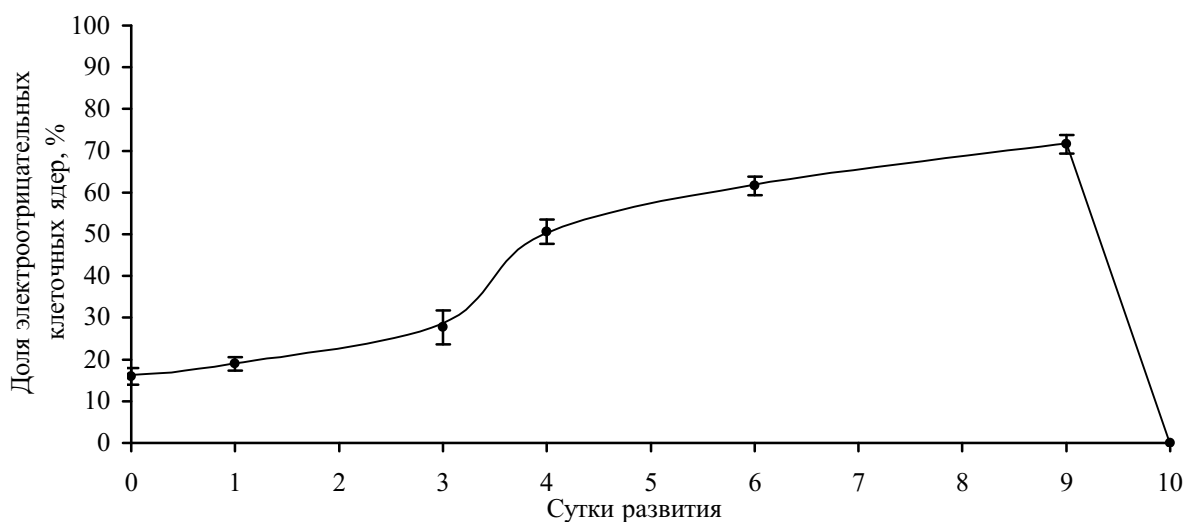


Рис. 3. Изменение электрокинетических свойств ядер сперматогенных клеток в процессе инкубации куколок дубового шелкопряда линии I<sub>4</sub>.

В 1-е сутки развития (в 0-е для дубового шелкопряда) электрофоретическая подвижность клеточных ядер была наименьшей, и составляла  $14,3 \pm 1,4$  % для породы Б-2,  $17,5 \pm 1,5$  % – для гибрида Б-2×Б-1 и  $16,0 \pm 2,0$  % – для линии I<sub>4</sub>. В дальнейшем электрофоретическая подвижность ядер гаметоцитов постепенно возрастала до 3-х суток инкубации у породы Б-2 и линии I<sub>4</sub>, и до 4-х суток – у гибрида. На следующие сутки развития наблюдалось резкое увеличение электрофоретической подвижности ядер на 30,5 % у породы Б-2, на 35 % – у гибрида Б-2×Б-1 и на 22,9 % – у линии I<sub>4</sub>. После чего доля электроотрицательных ядер гаметоцитов продолжала плавно возрастать вплоть до 9 суток инкубации куколок, когда исследуемый показатель достигал своего максимального значения:  $90,0 \pm 3,0$  % – для породы Б-2,  $84,0 \pm 2,5$  % – для гибрида и  $71,6 \pm 2,2$  % – для линии I<sub>4</sub>. На 10-е сутки развития куколок, то есть в последние сутки перед выходом имаго доля подвижных ядер падала до нуля.

Таким образом, у тутового и дубового шелкопрядов выявлена сходная тенденция изменения электрокинетических свойств ядер гаметоцитов: возрастание доли электроотрицательных ядер в процессе сперматогенеза и снижение этого показателя до нуля в последние сутки инкубации. Выраженный эффект гетерозиса по данному показателю установлен не был.

Результаты исследования дыхания куколок дубового шелкопряда представлены на рис. 4.

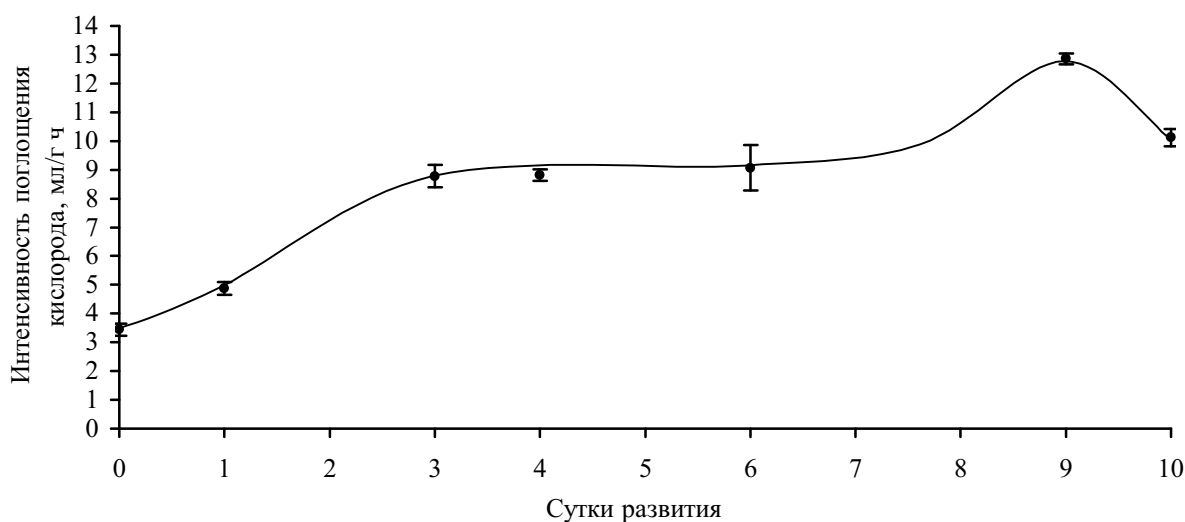


Рис. 4. Интенсивность поглощения кислорода куколками дубового шелкопряда в процессе весенней инкубации.

Динамика изменения интенсивности поглощения кислорода во многом сходна с динамикой изменения электрокинетических свойств ядер гаметоцитов. Минимальное значение данного показателя ( $3,44 \pm 0,21$  мл/г·ч) было зафиксировано на 0-е сутки инкубации куколок. В течение инкубации интенсивность дыхания возрастала, достигая максимального значения ( $12,86 \pm 0,19$  мл/г·ч) на 9-е сутки развития. В последние сутки инкубации интенсивность поглощения кислорода несколько снижалась, оставаясь, тем не менее, на достаточно высоком уровне ( $10,12 \pm 0,50$  мл/г·ч).

**Обсуждение.** Переходя к обсуждению полученных результатов, необходимо уточнить на какой стадии развития находятся половые клетки в семенниках во время исследования. Литературные данные (Sado, 1963; Захидов, Маршак, 1978) указывают на то, что мейотические деления в семенниках тутового шелкопряда происходят на стадии гусеницы V возраста. Следовательно, во время развития куколки в семенниках наблюдаются сперматиды, а непосредственно перед выходом имаго – сперматозоиды. Эти данные хорошо согласуются с нашими наблюдениями изменения морфологии гаметоцитов.

Следует заметить, что сперматогенные клетки у насекомых развиваются внутри обособленных семенных шаров, покрытых оболочкой, и в пределах сперматоцисты развитие половых клеток идет синхронизировано, то есть практически все клетки вступают в новую стадию развития одновременно (Fawcett, 1972). Однако в разных семенных шарах на одном и том же этапе развития шелкопряда могут содержаться сперматогенные клетки, находящиеся на различных стадиях развития (Sado, 1963). Поэтому в семенниках куколки (особенно в начале инкубации) могут в небольшом количестве встречаться сперматоциты I и II, и даже сперматогонии, а также зрелые сперматозоиды. В процессе нашего исследования единичные семенные пучки, содержащие зрелые сперматозоиды, были отмечены, начиная с 4 суток развития куколок.

Считается, что доля электроотрицательных клеточных ядер, отражающая значение  $\zeta$ -потенциала клеточных ядер, тесно связана с активностью ядра (Чешко, Шахбазов, 1977; Шкорбатов, Шахбазов, 1992). Кроме того, электрокинетических свойств клеточных ядер определяются количественным и качественным составом РНК, кислых и основных белков ядра (Шкорбатов, Шахбазов, 1982). Таким образом,

полученные кривые изменения электрокинетических свойств ядер гаметоцитов отражают структурные и функциональные изменения в ядрах, происходящие во время спермиогенеза.

Обнаруженное возрастание электрофоретической подвижности ядер в процессе спермиогенеза свидетельствует об усилении метаболических процессов в ядре, ядерно-плазменного транспорта и поляризации структур ядра. В литературе имеются указания на высокую активность генома развивающихся мужских половых клеток (Костомарова, Князева, 1982): синтез различных типов РНК во время спермиогенеза, миграция её в цитоплазму (Galdieri, Monesi, 1974), ацетилирование гистонов (Bouvier, Chevallier, 1976). Также известно, что в спермиогенезе происходит коренная перестройка структур ядра (Данилова, 1978): смена типа ядерного белка, связанная с синтезом новой белковой фракции и транспортом вновь синтезированного белка в ядро (Bloch, Brack, 1964; Захидов, Маршак, 1978). Таким образом, изменение  $\zeta$ -потенциала, являющегося интегральным показателем активности ядерного метаболизма, отражает процессы происходящие в ядрах сперматид.

Резкое возрастание доли электроотрицательных клеточных ядер в середине развития куколки, очевидно, свидетельствует о значительных изменениях в метаболизме ядра. Такие изменения могут быть связаны с началом активных синтетических процессов или модификацией ядерных структур. Обнаруженное в настоящей работе, резкое повышение доли электроотрицательных клеточных ядер гаметоцитов совпадает по времени с пиком содержания гормона экдизона в гемолимфе куколки (Calvez, Hirn, Reggi, 1977). В это время начинается интенсивная перестройка организма, связанная с имагинальным морфогенезом. Однако на данном этапе исследований невозможно дать точное объяснение наблюдавшемуся эффекту.

Учитывая вышесказанное, снижение количества электроотрицательных ядер до нуля в последние сутки инкубации куколок объясняется тем, что к этому времени формируются зрелые сперматозоиды. Их метаболизм находится на очень низком уровне, а заряд ядра скомпенсирован. На основании этих результатов можно предложить метод определения степени зрелости сперматозоидов тутового и дубового шелкопряда по их электрофоретической подвижности.

Закономерное возрастание интенсивности поглощения кислорода куколкой в процессе развития указывает на повышение уровня метаболических процессов в организме. Одним из наиболее интенсивно протекающих и энергоёмких процессов в течение метаморфоза является сперматогенез. Рассмотренная динамика изменения интенсивности дыхания у куколок дубового шелкопряда является подтверждением вывода, сделанного при обсуждении динамики изменения электрокинетических свойств гаметоцитов. Полученные результаты указывают на наличие определенной связи между интенсивностью дыхания куколки и электрокинетических свойств ядер гаметоцитов, так как оба показателя закономерно и сходным образом изменяются в процессе инкубации куколок.

Интенсивность дыхания представляет собой показатель физиологического состояния всего организма. Энергия, извлекаемая в процессе окисления органических веществ, используется в различных процессах протекающих в организме развивающейся куколки. Поэтому в последние сутки развития, хотя метаболическая активность сперматозоидов незначительна и доля электроотрицательных клеточных ядер гамет падает до нуля, интенсивность дыхания лишь немного снижается. Достаточно высокий уровень потребления кислорода необходим для поддержания значительного числа метаболических процессов в организме, связанных с окончанием формирования имагинальных органов и подготовкой куколки к куколочно-имагинальной линьке.

#### **В ы в о д ы .**

1. Впервые показана возможность применения методики внутриклеточного микроэлектрофореза для оценки электрокинетических свойств ядер сперматогенных клеток тутового и дубового шелкопряда.

2. Обнаружено закономерное возрастание электрофоретической подвижности ядер гаметоцитов в течение развития куколок тутового и дубового шелкопряда.

3. Установлено отсутствие подвижности ядер зрелых сперматозоидов, что очевидно связано с остановкой метаболических процессов в них и уравниванием зарядов их ядер.

4. Предлагается применение внутриклеточного микроэлектрофореза для определения степени зрелости мужских половых клеток.

5. Продемонстрирована связь электрокинетических свойств ядер гаметоцитов с интенсивностью поглощения кислорода и, соответственно, уровнем окислительных процессов в организме.

6. Подтверждена связь  $\zeta$ -потенциала ядра клетки с его метаболической активностью.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Данилова Л. В.* Сперматогенез у диплоидов и полиплоидов тутового шелкопряда. – М.: Наука, 1976. – 164 с.  
*Данилова Л. В.* Ультраструктурное исследование сперматогенеза. – М.: Наука, 1978. – 205 с.  
*Захидов С. Т., Маршак Т. Л.* Основные ядерные белки в сперматогенезе у диплоидных и полиплоидных форм тутового шелкопряда *Bombyx mori*. I. Количественный и качественный анализ гистонов в ядрах сперматогенных клеток диплоидных животных // Цитология. – 1978. – Т. 20, № 3. – С. 298–306.  
*Костомарова А. А., Князева Е. Ф.* Транскрипция и трансляция в сперматогенезе // Современные проблемы сперматогенеза. – М.: Наука, 1982. – С. 160–183.  
*Никольская И. С., Грудницкий В. А.* Влияние рентгеновского облучения и ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот на дыхание и содержание АТФ в зародышах вьюна // Докл. АН СССР. – 1970. – Т. 194, № 2. – С. 478–480.

- Радзинская Л. И., Никольская И. С.* Энергетика развития тутового шелкопряда // Онтогенез. – 1972. – Т. 3, № 6. – С. 602–608.
- Скулачев В. П.* Аккумуляция энергии в клетке. – М.: Наука, 1969. – С. 11–42.
- Страшинок В. Ю.* Изменения электрокинетических свойств клеточных ядер *Drosophila melanogaster* М.-Г., обусловленные генотипическими различиями, возрастом и действием теплового шока: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Х., 1988. – 17 с.
- Чешко В. Ф., Шахбазов В. Г.* Зміни електрокінетичних властивостей клітинних ядер під впливом регуляторів біосинтезу нуклеїнових кислот у зв'язку з структурою ядра і функціональною активністю генів // Докл. АН УРСР, Б. – 1977. – № 1. – С. 88–90.
- Шахбазов В. Г.* Простые приборы для изучения дыхания и активности каталазы семян // Вопросы семеноводства, семеноведения и контрольно-семенного дела. – К.: Урожай, 1964. – Вып. 2. – С. 124–128.
- Шахбазов В. Г.* Нова генетична гіпотеза на основі біофізичних дослідів // Організм як система. – К.: Наукова думка, 1966. – С. 98–106.
- Шахбазов В. Г., Лобынцева Г. С.* Биоэлектрические свойства ядра и ядрышка в клетках растений в связи с генотипом физиологическим состоянием и действием высокой температуры // Биофизика. – 1971. – Т. XVI, вып. 3. – С. 457–461.
- Шкорбатов Ю. Г., Шахбазов В. Г.* О роли нуклеиновых кислот и других биополимеров в образовании электрического заряда клеточного ядра // Молекулярная генетика и биофизика. – 1982. – Вып. 7. – С. 35–38.
- Шкорбатов Ю. Г., Шахбазов В. Г.* Биоэлектрические свойства клеточных ядер // Успехи соврем. биологии. – 1992. – Т. 112, вып. 4. – С. 499–511.
- Bloch D. P., Brack S. D.* Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermatogenesis in the grasshopper *Chortophaga viridifasciata* // J. Cell Biol. – 1964. – Vol. 22, № 2. – P. 327–340.
- Bouvier D., Chevallier P.* A correlation between histone acetylation and chromatin changes in spermatids of the locust // Cytobiologie. – 1976. – Vol. 12, № 2. – P. 287–304.
- Calvez B., Hirn M., Reggi M. de* Ecdysone changes in the haemolymph of two silkworms (*Bombyx mori* and *Philosamia cynthia*) during larval and pupal development // FEBS Letters. – 1977. – Vol. 71. – P. 57–61.
- Fawcett D. W.* Observations on cell differentiation and organelle continuity in spermatogenesis // Edinburgh symposium on the genetics of the spermatozoon. – 1972. – P. 37–68.
- Galdieri M., Monesi V.* Ribosomal RNA in mouse spermatocytes // Exp. Cell Res. – 1974. – Vol. 85, № 2. – P. 287–295.
- Sado T.* Spermatogenesis of the silkworm and its bearing on radiation -induced sterility // J. Fac. Agr. Kyushu Univ. – 1963. – № 12. – P. 359–404.

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Поступила 15.02.2001

UDC 575.16:576.3:577.3:595.787

YA. R. BADRADINOV, V. G. SHAKHBAZOV

**CHANGE OF ELECTROKINETIC PROPERTIES OF CELL NUCLEI OF CHINESE, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA: LYMANTRIIDAE) AND OAK, *ANTHRAEA PERNYI* GUÉRIN (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) SILKWORMS DURING SPERMATOGENESIS**

*Kharkov National University*

## SUMMARY

Bioelectrical properties of male gametocyte nuclei of oak and Chinese silkworms during pupal development have been studied for the first time. Data obtained were compared with the intensity of oxygen consumption by the pupa. It was observed that during pupal development, electrophoretic mobility of gametocyte nuclei changes similarly in both species. The lowest mobility was observed at the beginning of the development; in the following days it gradually increased, reaching maximum on the penultimate day of incubation. No mobility was detected on the last day of development. Electrophoretic mobility was found to correlate with metabolic activity of the nucleus, which was estimated by increased oxygen consumption rate. The connection between  $\zeta$ -potential of the nucleus and its metabolic activity is confirmed.

4 figs, 20 refs.