

УДК: 595.143.2

Использование пропионо-гемаatokсиліна в изучении зародышевой линии медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* (Clitellata, Hirudinea)

Н.В.Коваленко, К.А.Дорошенко, В.В.Клименко, А.Ю.Утевский, С.Ю.Утевский

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
Serge.Yu.Utevsky@univer.kharkov.ua*

Приведено подробное описание методов и результатов изучения мейотических делений в сперматогенезе медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*. По данным, полученным для метафазы I (поздняя диплотена), можно утверждать, что гаплоидный набор хромосом этого вида составляет 14.

Ключевые слова: *Hirudo medicinalis*, хромосомы, пропионо-гемаatokсилін.

Введение

Несмотря на то, что использование пиявок во врачебной практике известно с незапамятных времен, сведений о генетике этого объекта вообще и цитогенетике в частности имеется немного. Более того, даже таксономический статус используемых в медицине пиявок оказался недостаточно изученным и был подвергнут в недавнее время ревизии с помощью молекулярно-генетических методов (Trontelj, Utevsky, 2005; Utevsky, Trontelj, 2005). Возникла необходимость вернуться к более пристальному изучению цитогенетики этой интереснейшей группы животных, в особенности к установлению числа хромосом, что не было сделано до сих пор даже для медицинской пиявки.

Материалы и методы

Для цитологического изучения зародышевой линии пиявок использовали взрослых особей медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* размером 8–8,5 см в наркотизированном состоянии. У таких пиявок можно найти практически все стадии формирования половых продуктов в мужских гонадах. Особый интерес для нас представляло изучение мейотических делений в сперматогенезе, поскольку для этой цели в каждой пиявке можно найти около 10 пар расположенных по продольной оси тела семенников.

Пиявок обездвигивали наркотизированием, для чего их погружали в 10%-й спирт на 15–20 мин. После разреза на брюшной стороне закрепленной иголками пиявки гонады легко обнажаются; их аккуратно вырезают и сразу фиксируют в фиксаторе Карнуа (3:1, 100%-й спирт и ледяная уксусная кислота). Каждую пару семенников фиксировали в отдельной пробирке и оставляли в фиксаторе не меньше суток.

Окрашивание фиксированного материала производили пропионо-гемаatokсиліном при соотношении краски и железоммонийных квасцов 1:1, выдерживая окрашиваемые гонады в термостате при 54°C в течение суток (Henderson, Lu, 1968). Окрашенный таким способом семенник переносили на стекло с лункой, заполненной ацетохлоралгидратом (АХГ), разрывали и частично или полностью удаляли его оболочку; затем интересующие участки гонады изолировали микроиглами под стереомикроскопом; выделенные кусочки окрашенного материала для просветления и набухания пипеткой сначала переносили в свежий раствор АХГ, а далее – на предметное стекло и раздавливали покровным стеклом в капле АХГ (Клименко, 1972). Для предотвращения высыхания края покровного стекла обводили лаком. Полученные таким образом препараты могут сохраняться длительное время.

Результаты и обсуждение

Семенники пиявки заполнены многочисленными цитофорами, которые на малом увеличении видны в поле зрения в виде россыпей шаров. При большом увеличении каждый такой цитофор оказывается носителем определенного этапа сперматогенеза, поскольку практически все половые клетки, тесно покрывающие его поверхность, находятся на одной стадии развития. Цитофоры одного семенника зрелой пиявки, точнее одной пары семенников, представляют почти весь спектр стадий сперматогенеза, при этом в более зрелых особях этот спектр сдвинут в сторону последних стадий формирования сперматозоидов, а в молодых особях – в сторону ранних, премейотических стадий. В первом случае наблюдается большое количество уменьшившихся в размерах цитофоров, покрытых сперматидами и сперматозоидами, во втором случае более крупные цитофоры несут множество клеток с интерфазными ядрами и четким зернистым хроматином.

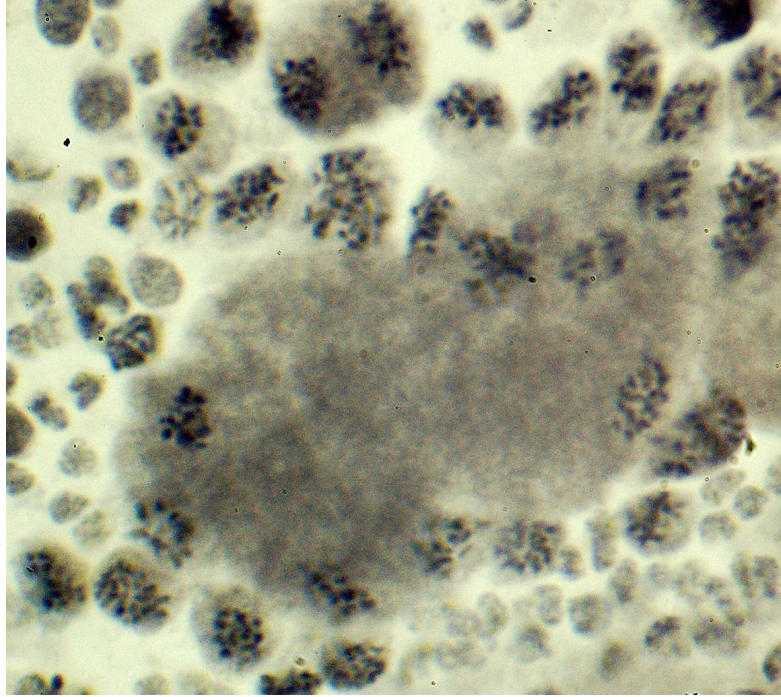


Рис. 1. Часть цитоплазмы со сперматоцитами в поздней диплоте (метафазе I). На этой стадии можно производить подсчет числа хромосом (об. 40×)

Хромосомы пиявки сравнительно мелкие. Трудности определения числа хромосом связаны с их тесным расположением в ядре, взаимным перекрыванием. Наиболее удобными стадиями являются стадии, близкие к метафазе I (рис. 1). На удачных препаратах подсчеты дают 14 бивалентов (рис. 2), однако окончательное заключение будет сделано после кариотипирования.

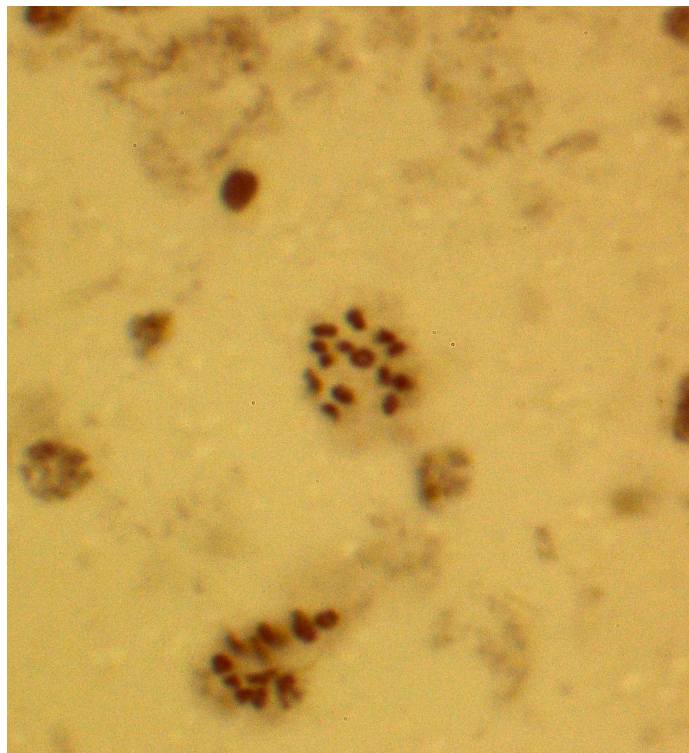


Рис. 2. В метафазе I (поздняя диплоте) можно выявить 14 бивалентов (об. 100×)

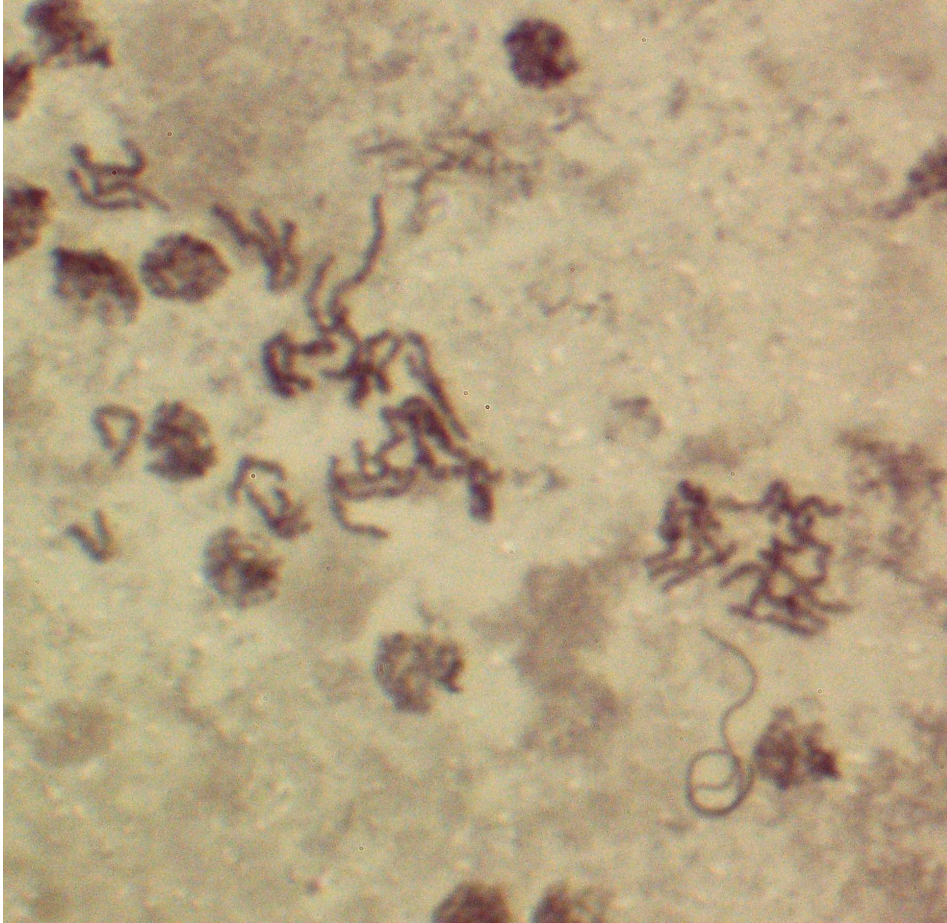


Рис. 3. Пахитенные хромосомы пиявки. В правом нижнем углу сперматозоид

Наиболее длинными хромосомы становятся в средней пахитене, и на хороших препаратах в них выявляется поперечная исчерченность (рис. 3), которая может в дальнейшем быть использована для идентификации хромосом. Затруднения в определении числа хромосом на этой стадии связаны с наличием «хромоцентров», в которых хромосомы могут соединяться и их индивидуальность становится неопределенной.

С использованием данного метода в настоящее время проводятся исследования и других видов пиявок, которых принимали ранее за *Hirudo medicinalis*. Данные молекулярно-генетической классификации будут сопоставлены с данными цитоморфологического и генетического анализа зародышевой линии клеток, что представляет значительный общебиологический интерес.

К преимуществам предлагаемого метода следует отнести возможность использования для анализа материала, зафиксированного много лет назад и хранящегося в формалине, что уже было проверено на различных животных, в частности, на земноводных (Г.А.Мазепа, личное сообщение).

Благодарности

Это исследование было поддержано грантом INTAS Ref. Nr 05-1000008-8147 и Министерством образования и науки Украины.

Список литературы

- Клименко В.В. Использование пропионо-гематоксилина для подсчета клеток в яйцах насекомых // Онтогенез. – 1972. – Т.3, №3. – С. 326–329.
- Henderson S.A., Lu B.C. The use of haematoxylin for squash preparations of chromosomes // Stain Technology. – 1968. – Vol.43. – P. 233–236.
- Trontelj P., Utevsky S.Y. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*) // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2005. – Vol.34. – P. 616–624.
- Utevsky S.Y., Trontelj P. A new species of the medicinal leech (Oligochaeta, Hirudinida, *Hirudo*) from Transcaucasia and an identification key for the genus *Hirudo* // Parasitology Research. – 2005. – Vol.98, №1. – P. 61–66.

Використання пропіоно-гематоксиліну у вивченні зародкової лінії медичної п'явки *Hirudo medicinalis* (Clitellata, Hirudinea)**Н.В.Коваленко, К.О.Дорошенко, В.В.Клименко, А.Ю.Утевський, С.Ю.Утевський**

Надається детальний опис методів і результатів дослідження мейотичних поділів у сперматогенезі медичної п'явки *Hirudo medicinalis*. За даними, отриманими для метафази I (пізня диплотена), гаплоїдний хромосомний набір цього виду складає 14.

Ключові слова: *Hirudo medicinalis*, хромосоми, пропіоно-гематоксилін.

The use of propionic hematoxylin in a study of the germ line of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* (Clitellata, Hirudinea)**N.V.Kovalenko, K.A.Doroshenko, V.V.Klimenko, A.Y.Utevsky, S.Y.Utevsky**

The detailed account of methods and results of an examination of meiotic divisions in the spermatogenesis in the medicinal leech *Hirudo medicinalis* is depicted. Data for metaphase I (late diplotene) suggest that the haploid chromosomal number of this species is 14.

Key words: *Hirudo medicinalis*, chromosomes, propionic hematoxylin.

**Представлено Т.Ю.Маркіною
Рекомендовано до друку Є.Е.Перським**