

ЗООЛОГИЯ

УДК 597.533.2.591.46

М. В. Мосягина, О. В. Зеленников

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА СОСТОЯНИЕ СТЕРОИДСЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК У МОЛОДИ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

К настоящему времени в литературе накоплено много сведений о роли стероидсекреторных клеток (СК) в регуляции процессов дифференцировки пола у рыб [1–5]. Вместе с тем все имеющиеся по данной теме работы посвящены анализу естественного протекания этого процесса у разных видов рыб. Цель нашей работы, также посвященной исследованию регуляции дифференцировки пола, — впервые проанализировать состояние СК после гормонального воздействия на ход оо- и сперматогенеза.

Материалы и методы исследования

Стероидсекреторные клетки исследовали в гонадах молоди горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) и кижуча (*O. kisutch*), которых обрабатывали гормональными препаратами в разном возрасте и при различном исходном состоянии гонад. Всего было поставлено четыре опыта, для проведения которых икру лососей на стадии пигментации глазных бокалов доставляли в лабораторию ихтиологии СПбГУ: горбуши — с Выгского (Республика Карелия) и Анивского (Сахалинская обл.), кижуча — с Буюкловского рыбодных заводов (Сахалинская обл.). В лаборатории икру и личинок содержали при температуре воды 9–11°C, а молодь после начала кормления — при температуре 15–18°C. В первом и втором опытах инъекцию гормона делали непосредственно в желточный мешок эмбрионов и личинок. В третьем и четвертом — гормон задавали с кормом.

Опыт 1: зародышам горбуши, гонады которых находились в индифферентном состоянии, с целью повлиять на ход феминизации половых желез, была сделана инъекция 1%-ного масляного раствора тестостерона пропионата. Доза гормона составила 4 мкг/икринку или 24 мкг/г массы. Пик вылупления зародышей пришелся на 14-е сутки после воздействия. Фиксацию гонад для электронно-микроскопического исследования провели через 108 сут после воздействия в возрасте 94 сут после вылупления.

Опыт 2: личинкам горбуши в возрасте одних суток после вылупления была проведена инъекция 0,1%-ного раствора эстрадиола дипропионата с целью повлиять на ход инверсии пола у самцов и формирование фонда ооцитов у самок. Доза гормона составила 4 мкг/особь. Ультраструктурный анализ состояния СК проводили через 76 сут после воздействия.

Опыт 3: на молодь горбуши с возраста 55 сут от вылупления оказывали воздействие масляным раствором 0,1%-ного эстрадиола дипропионата в течение 30 сут с целью: у самцов вновь вызвать вторичную феминизацию гонад после завершения естественной инверсии пола; у самок — стимулировать пополнение фонда ооцитов. Гормональный препарат замешивали в корм — замороженный мотыль из расчета 50 мкг/г массы тела.

Опыт 4: на молодь кижуча с возраста 58 сут оказывали воздействие эстрадиолом-17 β , который задавали с кормом в течение 42 сут с целью повлиять на формирование фонда ооцитов. Гормон предварительно растворяли в спирте и замешивали в гранулированный корм из расчета 100 мг/кг корма.

Молодь обоих видов кормили комбинированным кормом производства «Биомар» (Дания), рассчитывая периодичность кормления и суточную норму корма, согласно приложенным к нему рекомендациям с учетом возраста рыб и температуры воды.

Фиксацию гонад у всех особей проводили в 6%-ном глутаральдегиде на каккодидлатном буферном растворе (рН 7,2–7,4) в течение 2 ч при 4°C. Затем после промывки материал дофиксировали в 1%-ном растворе OsO₄ на том же буфере, и после обезвоживания в спиртах и ацетоне заливали в Эпон-812. Полутонкие срезы, полученные на ультратоме LKB-III и Ultracut, окрашивали метиленовым синим. Ультратонкие срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца [6]. Готовые препараты просматривали на электронном микроскопе Tesla-500.

Стероидсекреторные клетки в гонадах идентифицировали по характерным для них ультраструктурным признакам — митохондриям с трубчато-везикулярными кристами, канальцам агранулярного эндоплазматического ретикулула и липидным включениям [7].

Для оценки функциональной активности СК проводили количественный анализ, в ходе которого измеряли размеры самих СК, их ядер, диаметры митохондрий, канальцев эндоплазматического ретикулула и различных включений, а также относительные объемные плотности этих ультраструктур. Клетки, выявленные в составе оболочек ооцитов: теки и гранулезы имели уплощенную форму; их размеры представляли по наибольшему и наименьшему диаметру (например: $8,7 \pm 0,62 \times 2,6 \pm 0,18$ мкм). Клетки, локализованные в строме или оболочке гонад, имели полигональную форму; их размеры представляли как полусумму большого и малого диаметров. Измерения проводили по стандартным методикам [8–10] с использованием компьютерной системы анализа изображений «ВидеоТест-Морфа». Обработку данных проводили с помощью стандартных статистических программ. Для сравнения средних значений использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты исследования

Опыт 1. Влияние тестостерона пропионата на гаметогенез горбуши в период протогинической феминизации гонад у зародышей. Воздействие тестостерона пропионата не предотвратило феминизацию гонад у зародышей как будущих самок, так и будущих самцов, а также не оказало заметного влияния на последующую естественную инверсию пола у генотипических самцов. Вместе с тем у самок последствия однократного гормонального воздействия проявились значительно позже, уже в процессе формирования в яичниках фонда превителлогенных ооцитов, и выразились в умень-

шении числа и снижении темпа роста клеток этого периода [11]. Для анализа возможного отсроченного действия экзогенного тестостерона на развитие гонад исследовали состояние СК у рыб через 108 сут после инъекции гормона (в возрасте 94 сут после вылупления). В момент фиксации длина и масса контрольных и подопытных рыб были сходными и варьировали от 35 до 47 мм и от 220 до 420 мг соответственно. В яичниках тех и других рыб в момент фиксации присутствовали преимущественно ооциты периода превителлогенеза (7–12 на поперечный срез) диаметром до 120–150 мкм, а также единичные гонии и мейоциты. В семенниках контрольных и подопытных самцов присутствовали только гонии.

У контрольных самок СК были обнаружены только в теке фолликулов превителлогенных ооцитов, а у самцов исключительно в эпителии семенников.

В отличие от этого у подопытных самок СК присутствовали как в теке фолликулов превителлогенных ооцитов, так и в стромах гонад. При этом большинство СК характеризовались сравнительно небольшими размерами, полигональной формой и находились именно в стромах яичников, располагаясь у многочисленных кровеносных капилляров, часто группами по 2–3. В ядрах этих клеток, округлой или вытянутой формы, можно было видеть характерное для СК пристеночное расположение хроматина (рис. 1А), а в цитоплазме каналцы хорошо развитой агранулярной эндоплазматической сети (АЭР), о чем можно судить по их среднему диаметру (0,21 мкм) и относительной объемной плотности в цитоплазме — 28,5% (таблица). Стероидсекреторные клетки в составе теки фолликулов (рис. 1Б) отличались уплощенной формой с веретеновидным ядром. Размеры этих клеток, а также диаметр митохондрий и каналцев агранулярной сети были достоверно меньше, чем в контроле. Отмечено также снижение объемной плотности этих органоидов в цитоплазме СК у подопытных самок (см. таблицу), и появление липидных включений размером в среднем $1,04 \pm 0,14$ мкм. Таким образом, активность СК в составе теки фолликулов превителлогенных ооцитов в яичниках подопытных самок понижается. При этом появляется большое количество активных СК в составе стромы.

В отличие от контрольных, у подопытных самцов СК располагались исключительно в стромах семенников. Диаметр митохондрий и каналцев агранулярной эндоплазматической сети был значительно меньше, чем у контрольных рыб (см. таблицу).

По совокупности полученных данных можно заключить, что состояние СК у контрольных и подопытных рыб, изученных нами спустя 108 сут после гормонального воздействия, как у самок, так и у самцов существенно различалось. Исследования, проведенные ранее [12], позволяют выделить основные направления развития секреторной функции гонад у молоди горбуши. Так, у самок с ростом превителлогенных ооцитов в яичниках происходит изменение локализации СК из стромы в оболочки ооцитов и увеличение функциональной активности СК в составе теки. У самцов в период инверсии пола СК располагаются только в стромах — наибольшая активность СК в стромах, а после завершения этого процесса — только в эпителии половых желез. Затем СК снова появляются в стромах, т. е. располагаются именно там, где и у взрослых рыб в период созревания [13]. Учитывая эти тенденции, следует отметить, что после воздействия тестостероном у подопытных самок горбуши гонады были менее развиты, а у самцов, напротив, более развиты, чем в контроле. Об этом можно судить по тому, что и в яичниках, и в семенниках СК локализованы преимущественно в стромах гонад. Однако если для самок это соответствует гонадам, менее развитым в плане становления

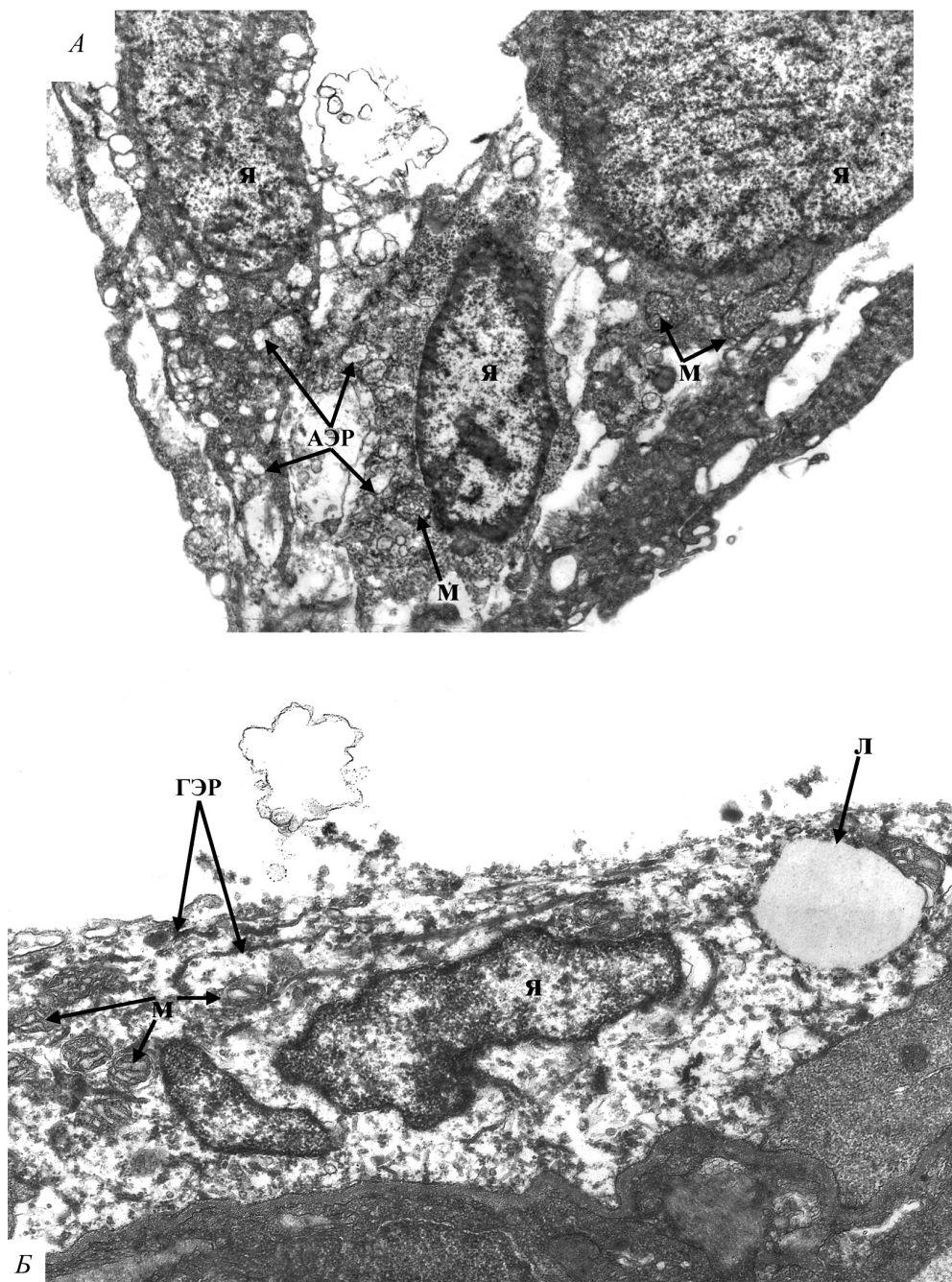


Рис. 1. Стероидсекреторные клетки в составе стромы (А) и в теке фолликула преовуляторного ооцита (Б) в яичнике подопытной самки горбуши после воздействия экзогенным тестостероном

На рис. 1 можно видеть ядро (я), митохондрии с трубчато-везикулярными кристами (м), каналцы гранулярного (ГЭР) и агранулярного эндоплазматического ретикулума (АЭР), а также липидные включения (л); Ув. (А) $\times 10200$. Ув. (Б) $\times 16500$.

Характеристика стероидсекреторных клеток (СК) в гонадах у молоди рыб после воздействия гормональными препаратами

Пол	Проба	Локализация СК	Средний диаметр, мкм (относительная объемная плотность, %)		
			СК	митохондрий	каналцев АЭР
<i>Горбуша через 108 сут (94 сут от вылупления) после инъекции раствора тестостерона пропионата зародышам с гонадами индифферентного состояния (ОП-1)</i>					
Самки	К	тека	10,1 ± 0,87 × 2,4 ± 1,26	0,58 ± 0,054 (15,7)	0,23 ± 0,026 (18,8)
		то же	7,3 ± 1,84 × 1,7 ± 0,06	0,44 ± 0,035 (10,5)	0,15 ± 0,022 (14,7)
	ОП	строма	5,2 ± 0,57	0,46 ± 0,033 (14,7)	0,21 ± 0,029 (28,5)
Самцы	К	эпителий	4,9 ± 0,82	0,62 ± 0,027 (12,7)	0,16 ± 0,029 (14,1)
	ОП	строма	4,3 ± 0,79	0,33 ± 0,017 (7,6)	0,12 ± 0,019 (16,9)
<i>Горбуша через 76 сут (76 сут от вылупления) после инъекции эстрадиола дипропионата личинкам после феминизации их гонад (ОП-2)</i>					
Самки	К	тека	11,9 ± 0,84 × 4,2 ± 0,53	0,59 ± 0,090 (16,1)	0,10 ± 0,019 (17,7)
		гранулеза	14,2 ± 1,72 × 2,3 ± 0,35	0,66 ± 0,060 (15,7)	0,16 ± 0,008 (16,2)
		строма	5,0 ± 0,68	0,46 ± 0,053 (10,6)	0,11 ± 0,013 (11,5)
	ОП	тека	12,0 ± 1,01 × 3,7 ± 0,56	0,48 ± 0,032 (15,3)	0,16 ± 0,017 (16,5)
		гранулеза	15,4 ± 2,03 × 2,1 ± 0,16	0,62 ± 0,092 (16,6)	0,11 ± 0,009 (16,0)
		строма	5,2 ± 0,72	0,47 ± 0,062 (13,8)	0,16 ± 0,017 (18,4)
Самцы	К	то же	7,5 ± 0,89	0,55 ± 0,034 (13,1)	0,23 ± 0,021 (21,7)
	ОП	гранулеза	20,6 ± 2,65 × 1,9 ± 0,27	0,75 ± 0,098 (25,0)	0,32 ± 0,048 (20,8)
		строма	5,5 ± 0,44	0,49 ± 0,045 (9,0)	0,16 ± 0,049 (14,5)
<i>Горбуша после окончания хронического воздействия эстрадиола дипропионата в возрасте от 55 до 85 сут от вылупления (после завершения естественной дифференцировки пола) (ОП-3)</i>					
Самки	К	тека	12,5 ± 0,97 × 2,9 ± 0,47	0,62 ± 0,030 (18,7)	0,25 ± 0,031 (18,9)
		гранулеза	13,4 ± 0,56 × 2,5 ± 0,24	0,71 ± 0,058 (12,7)	0,28 ± 0,033 (13,0)
		строма	5,1 ± 0,91	0,36 ± 0,030 (11,6)	0,16 ± 0,016 (21,5)
	ОП	тека	12,8 ± 1,09 × 2,3 ± 0,36	0,64 ± 0,056 (19,5)	0,21 ± 0,011 (17,6)
		гранулеза	16,1 ± 1,17 × 2,4 ± 0,72	0,61 ± 0,780 (13,5)	0,16 ± 0,020 (11,7)
		строма	10,7 ± 1,76	0,62 ± 0,046 (19,9)	0,21 ± 0,020 (15,5)
Самцы	К	эпителий	4,5 ± 0,35	0,69 ± 0,041 (14,3)	0,16 ± 0,021 (15,2)
	ОП	строма	6,6 ± 0,52	0,96 ± 0,043 (16,2)	0,32 ± 0,022 (13,7)
<i>Кижуч после окончания хронического воздействия эстрадиола-17β на молодь в возрасте от 58 до 100 сут от вылупления (ОП-4)</i>					
Самки	К	внешн. тека	6,7 ± 0,81	0,53 ± 0,025 (16,9)	0,19 ± 0,012 (27,3)
		внутр. тека	19,5 ± 1,10 × 6,2 ± 0,35	0,67 ± 0,058 (11,3)	0,11 ± 0,060 (15,8)
		гранулеза	15,8 ± 1,50 × 2,1 ± 0,30	0,71 ± 0,056 (23,4)	0,17 ± 0,021 (22,3)
		строма	9,0 ± 1,43	0,42 ± 0,078 (19,0)	0,16 ± 0,019 (14,6)
	ОП	тека	10,7 ± 0,85 × 1,2 ± 0,27	0,44 ± 0,015 (9,0)	0,15 ± 0,035 (9,1)
		строма	7,7 ± 1,77	0,42 ± 0,030 (8,1)	0,11 ± 0,009 (12,5)
Самцы	К	строма 1	6,3 ± 0,42	0,75 ± 0,051 (29,6)	0,21 ± 0,019 (17,8)
		строма 2	8,4 ± 1,06	0,41 ± 0,085 (5,8)	0,13 ± 0,014 (20,3)
		эпителий	8,8 ± 0,81	0,66 ± 0,051 (10,5)	0,35 ± 0,040 (32,6)
	ОП	гранулеза	28,5 ± 0,96 × 4,8 ± 0,94	0,59 ± 0,090 (24,6)	0,20 ± 0,019 (29,3)
		строма	8,7 ± 2,26	0,52 ± 0,093 (7,4)	0,12 ± 0,018 (10,4)

Примечание. К — контроль; ОП — опыт.

стероидсекреторной функции, то для самцов, напротив, гонадам с более развитой стероидсекреторной функцией.

Опыт. 2. Влияние эстрадиола на гаметогенез горбуши в период естественной инверсии пола. Однократная инъекция 0,1%-ного масляного раствора эстрадиола дипропионата в желточный мешок зародышей горбуши непосредственно после пика вылупления (возраст одни сутки) предотвращала естественную инверсию пола у генотипических самцов горбуши и стимулировала оогенез как у самок, так и у самцов [14, 15]. В возрасте 76 сут длина и масса контрольных и подопытных рыб в среднем были сходными и варьировали от 36,0 до 52,0 мм и от 220 до 428 мг соответственно. У контрольных самок присутствовали преимущественно ооциты периода превителлогенеза (5–15 на поперечный срез) диаметром до 150 мкм, а также единичные гонии и мейоциты. У самцов в контроле фонд половых клеток был представлен исключительно гониями. У самок в опыте состояние гонад по микроанатомической структуре, числу и составу половых клеток не отличалось от состояния яичников у контрольных рыб. В отличие от этого, у всех самцов в опыте помимо гониев в гонадах присутствовали ооциты периодов ранней профазы мейоза и превителлогенеза.

У всех контрольных самок СК были обнаружены в составе теки и гранулезы фолликулов превителлогенных ооцитов, а также в строме яичников. У самцов СК располагались только в строме семенников.

У подопытных самок СК, как и у рыб в контроле, располагались в теке, гранулезе и строме гонад. Анализируя СК, локализованные в составе теки фолликулов, у первых можно отметить достоверное ($p < 0,05$) уменьшение диаметра митохондрий, у вторых — диаметра канальцев агранулярной сети. Впрочем в обоих случаях уменьшение размеров органоидов было компенсировано увеличением числа митохондрий и объема сети, в результате чего их относительная объемная плотность у самок в контроле и опыте оказалась сходной (см. таблицу). Вместе с тем у подопытных рыб значительно увеличилось количество СК в составе стромы, где они образовывали скопления по 5–6 клеток (рис. 2А), и общее количество этих СК на срезе было сравнимо с количеством СК в составе теки фолликулов превителлогенных ооцитов. В этих клетках у подопытных рыб достоверно возрастает относительная объемная плотность митохондрий, а также объемная плотность и диаметр канальцев эндоплазматической сети, что, наряду с увеличением количества самих клеток в гонаде, говорит о возрастании их синтетической активности. Отметим также, что в яичниках подопытных самок преимущественно в периферической части цитоплазмы ооцитов значительно возрастало количество липидных включений, средний диаметр которых составил $1,23 \pm 0,158$ мкм.

Как было отмечено ранее, в семенниках всех подопытных самцов присутствовали ооциты периода превителлогенеза, резорбция которых была предотвращена экзогенным эстрадиолом. Однако в отличие от яичников генотипических самок у самцов ооциты занимали не более половины площади гонад на поперечных срезах. СК в этих гонадах располагались как среди стромальных клеток, так и в составе гранулезы оставшихся ооцитов периода превителлогенеза.

Функциональная активность СК, выявленных в строме семенников у подопытных рыб, явно была понижена. Об этом можно судить по достоверному ($p < 0,05$) уменьшению размеров как самих клеток, так и объема агранулярной сети и диаметра ее канальцев (см. таблицу). Функциональная активность СК в гранулезе у самцов, напротив, существенно повысилась, о чем свидетельствует достоверное, почти в 2 раза, увеличение

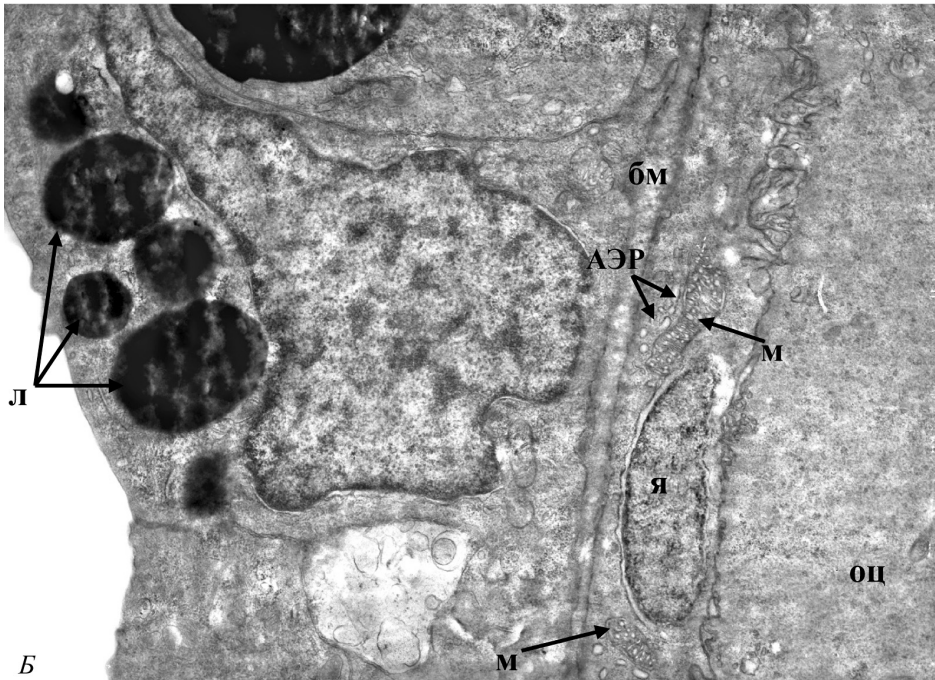
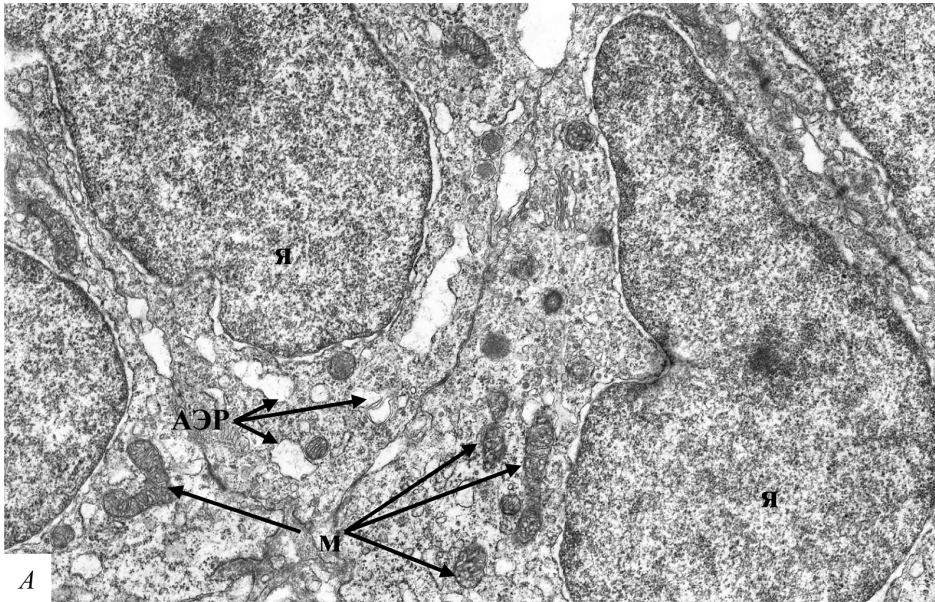


Рис. 2. Стероидсекреторные клетки в яичнике (А) и семеннике (Б) подопытных особей горбуши после воздействия экзогенным эстрадиолом в период естественной инверсии пола:

А — группа СК в строме. Ув. $\times 10400$; Б — в гранулезе превителлогенного ооцита. Ув. $\times 10000$. оц — цитоплазма превителлогенного ооцита, бм — базальная мембрана, остальные условные обозначения как на рис. 1.

диаметра канальцев агранулярной эндоплазматической сети (см. таблицу) и наличие многочисленных липидных включений (рис. 2 Б) диаметром $1,67 \pm 0,140$ мкм.

Таким образом, однократная инъекция эстрадиола дипропионата личинкам горбуши на этапе феминизации гонад не повлияла на ход развития яичников, однако у подопытных самок достоверно увеличилось число и активность СК в строме. В гонадах генотипических самцов волна оогенеза, вызванная гормональным воздействием, сопровождалась смещением стероидогенной активности из стромы в гранулезу фолликулов превителлогенных ооцитов.

Опыт 3. Влияние эстрадиола на гаметогенез горбуши после завершения периода естественной инверсии пола. В начале опыта в возрасте 55 сут от вылупления (длина рыб от 27,5 до 38,5 мм и масса от 108 до 161 мг) в яичниках уже была сформирована единая генерация превителлогенных ооцитов (7–15 на поперечный срез) диаметром 60–80 мкм, а в семенниках присутствовали только гонии. Воздействие эстрадиола дипропионата не оказало заметного влияния на развитие гонад у самок. В отличие от этого у самцов наблюдали усиление митотической активности гониев и формирование нового фонда ооцитов [16].

В момент окончания воздействия в возрасте 85 сут у самок в контроле СК располагались среди клеток гранулезы, теки фолликулов ооцитов, а также в строме яичников, преимущественно вблизи мелких кровеносных сосудов. При этом основная масса СК находилась в составе теки. У контрольных самцов СК располагались только в эпителии семенников, в основном вблизи крупного кровеносного сосуда и в основании мезорхия, поодиночке или небольшими группами (по 2–3 клетки).

У всех подопытных самок горбуши, как и у самок в контроле, СК были выявлены в составе гранулезы, теки и среди стромальных клеток; наибольшее их число обнаружено также в составе теки фолликулов. Морфофункциональное состояние СК в составе гранулезы и теки у подопытных и контрольных самок не различалось (см. таблицу). В отличие от этого размеры СК, локализованных в строме яичников у подопытных рыб, а также размеры ядер этих клеток, митохондрий и канальцев эндоплазматической сети были достоверно ($p < 0,05$) больше, чем у самок в контроле (см. таблицу). В этих клетках также присутствовали многочисленные липидные включения (до 18–20 шт. в клетке на срез), диаметр которых варьировал от 0,5 до 2,7 мкм (см. таблицу; рис. 3 А).

У подопытных самцов число СК в ходе гормонального воздействия существенно увеличилось, так что суммарная площадь их поперечных срезов занимала не менее 25% площади среза семенников. Эти клетки располагались не только в оболочке, но и в стромальной ткани гонад. Причем большая их часть располагалась именно в строме гонады группами по 5–6 клеток, окружая делящиеся гонии и ооциты периода ранней профазы мейоза. Это были крупные полигональные светлые клетки с округлыми ядрами (рис. 3 Б). Размер СК у подопытных рыб был достоверно ($p < 0,05$) больше, чем у контрольных, соответственно в среднем 6,6 и 4,5 мкм (см. таблицу). В цитоплазме этих клеток содержалось много крупных митохондрий округлой формы с большим количеством трубчато-везикулярных крист, диаметр которых в среднем также был достоверно ($p < 0,05$) больше, чем в СК семенников контрольных самцов (0,96 против 0,69 мкм), обширная агранулярная сеть, хорошо развитый аппарат Гольджи, лизосомы, большое количество свободных рибосом и многочисленные светлые липидные включения (см. таблицу).

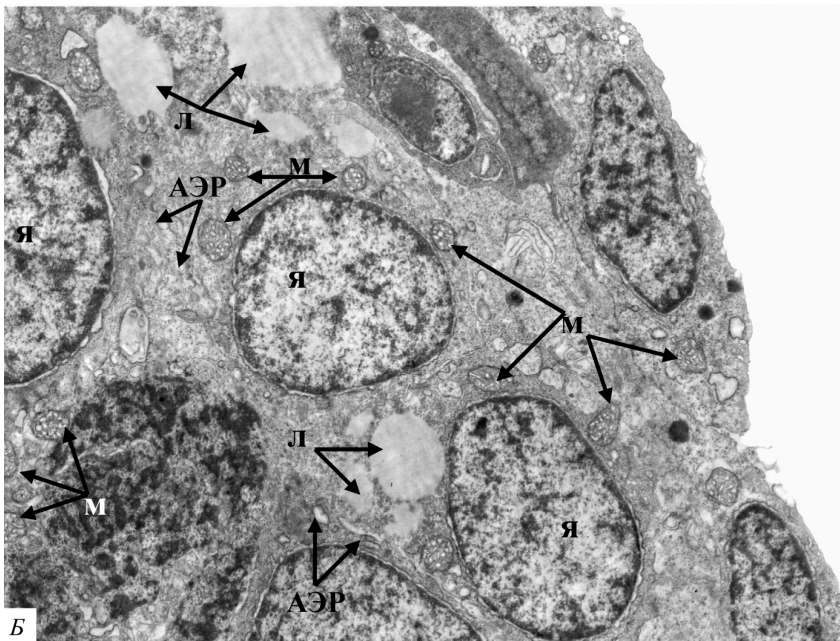
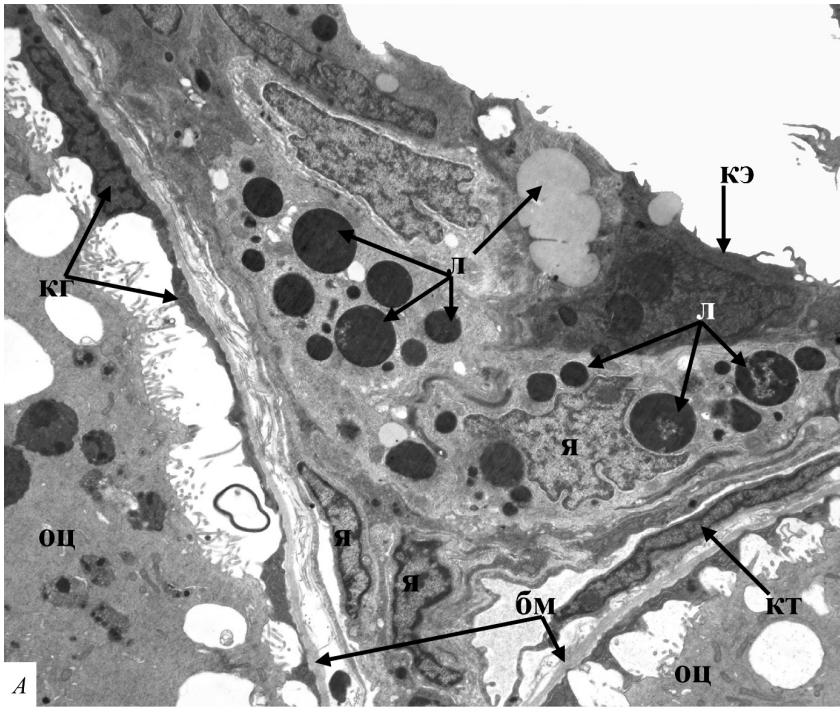


Рис. 3. Фрагменты ткани яичника (А) и семенника (Б) молоди горбуши после воздействия эстрадиолом в период после завершения естественной инверсии пола:

А — кэ — клетки эпителия, кг — клетки гранулы, кт — клетки теки. Ув. ×4000.
 Б — группа СК в строме. Все обозначения как на предыдущих рисунках. Ув. ×6500.

Анализируя полученные данные, можно сделать заключение, что гормональное воздействие оказало различное влияние на состояние яичников и семенников в целом и стероидсекреторных клеток в частности. У самок отмечено лишь накопление в цитоплазме СК, расположенных в строме, многочисленных липидных включений. Гормональное воздействие на самцов горбуши привело к значительному увеличению количества СК и повышению их синтетической активности, о чем свидетельствуют достоверное увеличение размеров СК, объема агранулярной эндоплазматической сети, рост числа и размеров митохондрий, появление множества липидных включений.

Опыт. 4. Влияние эстрадиола на гаметогенез кижуча в период дифференцировки пола и формирования у самок старшей генерации ооцитов. Воздействуя эстрадиолом на личинок кижуча, предполагали, с одной стороны, предотвратить дифференцировку гонад в направлении семенников или вызвать последующую инверсию пола у генотипических самцов, а с другой — повлиять на процессы формирования фонда половых клеток в яичниках еще до начала дифференцировки пола. В момент начала эксперимента в возрасте 58 сут от вылупления у всех личинок гонады находились в индифферентном состоянии, а половые клетки были представлены исключительно гониями. В ходе эксперимента личинки получали спиртовой раствор эстрадиола-17 β из расчета 100 мкг/г корма в течение 42 сут. В момент окончания воздействия в яичниках всех самок основную часть фонда половых клеток составляли ооциты периода превителлогенеза. Однако у подопытных самок как масса гонад ($10,2 \pm 0,2$ мг против $14,0 \pm 0,7$ мг), так и число ооцитов ($21,9 \pm 1,0$ против $25,3 \pm 1,7$) были меньше, чем у самок в контроле. У самцов в контроле фонд половых клеток был представлен исключительно гониями. У подопытных самцов, как и в опытах с горбушей, наблюдали формирование в семенниках фонда ооцитов.

У самок кижуча СК присутствовали в составе теки и гранулезы превителлогенных ооцитов, а также в строме яичников, причем в отличие от горбуши СК присутствовали среди клеток как внутренней, так и внешней теки. Отличительной особенностью СК в составе внутренней теки являлось присутствие в их цитоплазме липидных включений, количество которых у разных особей сильно варьировало (рис. 4А), а средний диаметр составил $1,04 \pm 0,05$ мкм. СК во внешней теке — это некрупные полигональные клетки с округлыми ядрами (рис. 4Б), содержавшие большое количество некрупных округлых митохондрий и хорошо развитую агранулярную эндоплазматическую сеть (см. таблицу). Липидные включения в цитоплазме этих клеток отсутствовали, а на их апикальной стороне выявляли картины экзоцитоза. СК в составе гранулезы были функционально активны, о чем свидетельствуют обширная агранулярная сеть, развитый аппарат Гольджи и множество крупных митохондрий (рис. 4В; см. таблицу). Многочисленные СК в строме яичника (до 7–11 на срез гонады) отличались полигональной формой с округлым или слаболопастным ядром. Они отличались наличием небольшого числа сравнительно мелких митохондрий, но в то же время хорошо развитой агранулярной сетью (см. таблицу).

У самцов кижуча обнаружено три типа СК, два из которых располагались в строме, а один в эпителии семенников. Одни СК, расположенные в строме семенников, имели вид некрупных полигональных клеток с округлыми или слаболопастными ядрами, в цитоплазме которых присутствовали крупные митохондрии с трубчатými кристами и умеренно развитая агранулярная эндоплазматическая сеть. Эти клетки преимущественно располагались в основании мезорхия у крупного сосуда

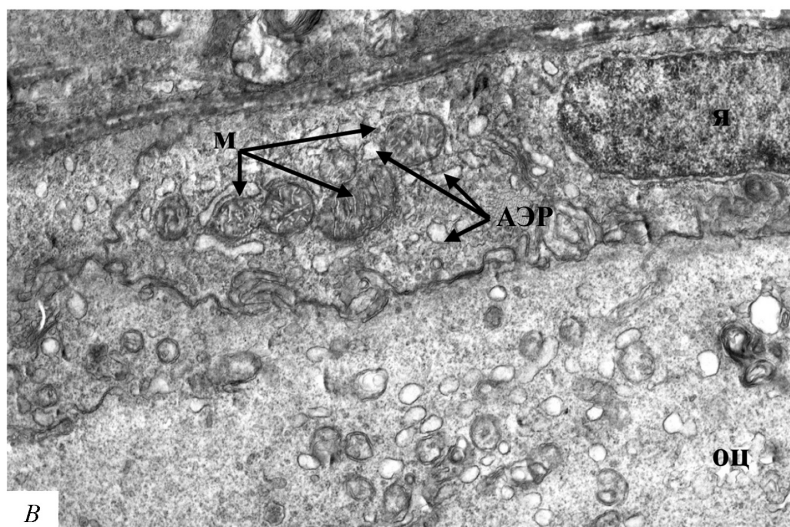
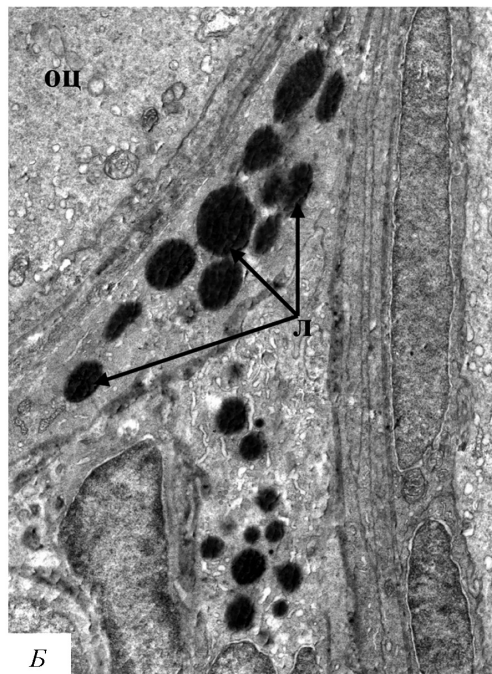
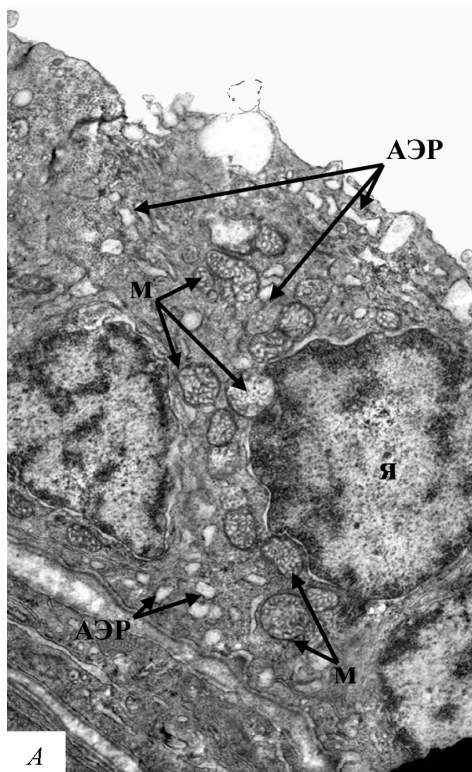


Рис. 4. Стероидсекреторные клетки в составе внешней (А) и внутренней (Б) теки и гранулы (В) фолликула превителлогенного ооцита в яичнике контрольной самки кижуча:

А — в цитоплазме видны митохондрии с трубчато-везикулярными кристами (м) и каналцы агранулярного эндоплазматического ретикулума (АЭР). Ув. $\times 10900$. Б — в цитоплазме содержатся липидные включения (л). Ув. $\times 7500$; В — в цитоплазме видны крупные митохондрии (м). Ув. $\times 12500$.

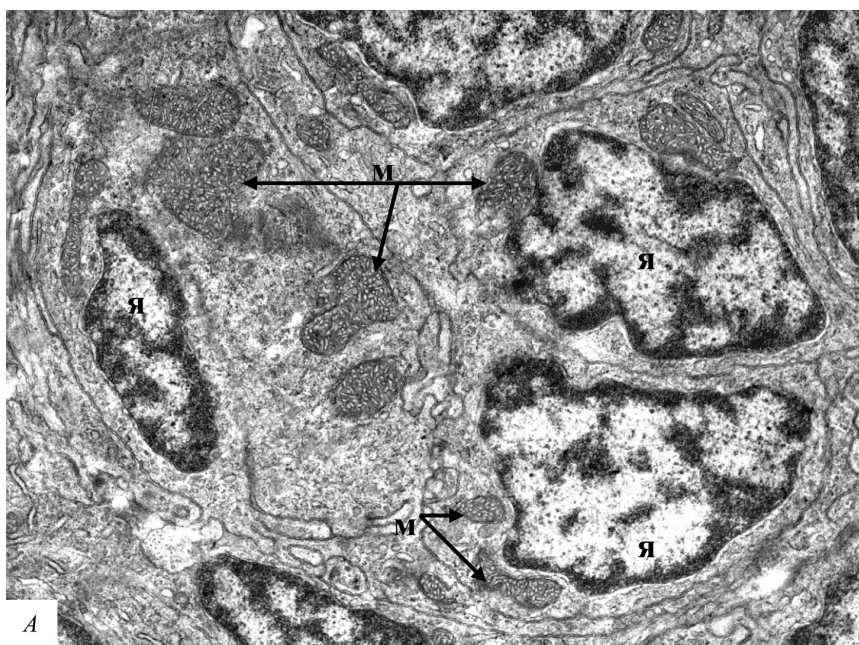
(см. таблицу; рис. 5 А). Другие СК — и в этом главное отличие семенников кижуча от семенников всех остальных исследованных лососевых — содержали в цитоплазме большое количество липидов (рис. 5 Б). Это были многочисленные клетки — до 10–12 на срез гонады. СК, расположенные в эпителии семенников (в среднем 2–3 клетки на срез гонады), отличались небольшим количеством крупных митохондрий и хорошо развитой агранулярной эндоплазматической сетью (см. таблицу).

После воздействия экзогенным эстрадиолом у самок, так же как в контроле, СК были обнаружены в составе теки и гранулезы фолликулов превителлогенных ооцитов и в строме яичников. Вместе с тем в теке мы обнаружили только один тип СК, активность которых была понижена, о чем свидетельствует достоверное ($p < 0,05$) уменьшение размеров как самих клеток, так и митохондрий (см. таблицу). СК в составе гранулезы у подопытных рыб, напротив, достоверно ($p < 0,05$) увеличились в размерах, что может свидетельствовать о возрастании секреторной активности. Размеры СК, расположенных в строме гонад подопытных самок, их ядер и органоидов значимо не отличались от таковых у СК в контроле (см. таблицу). Отличительной особенностью этих клеток было принципиальное (по сравнению с контролем примерно на порядок) увеличение в их цитоплазме липидных включений (рис. 6 А).

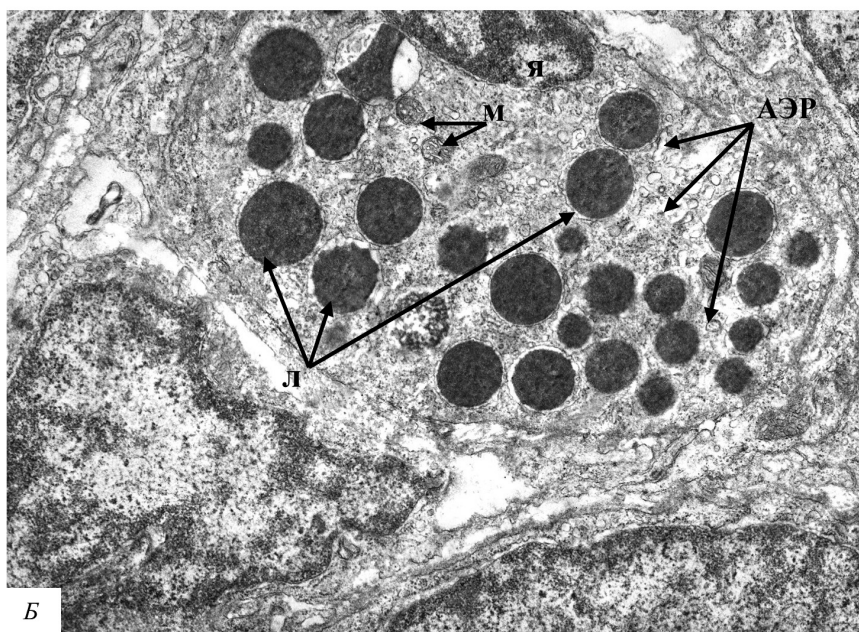
У самцов, как и в опыте с молодь горбуши (опыт 3), наблюдали формирование в семенниках фонда ооцитов, при этом СК были обнаружены как в составе гранулезы фолликулов превителлогенных ооцитов, так и в строме гонад. СК в составе гранулезы — это крупные вытянутые клетки, в цитоплазме которых содержались митохондрии с четко выраженными трубчато-везикулярными кристами и каналцы хорошо развитой агранулярной эндоплазматической сети (рис. 6 Б). Размеры данных клеток и их ядер были достоверно ($p < 0,05$) больше, чем у СК в составе гранулезы фолликулов ооцитов в яичниках у контрольных самок (см. таблицу), что может свидетельствовать о значительно большей их функциональной активности в семенниках подопытных самцов. В строме семенников у рыб в опыте обнаружен только один вид СК из описанных в составе стромы гонад у контрольных самцов — полигональные клетки с большим количеством липидных включений в цитоплазме. Состояние этих клеток у контрольных и подопытных рыб не различалось (см. таблицу).

Перед тем как обсудить полученные результаты, отметим, что только у молоди кижуча, не подвергнутой воздействию, мы обнаружили в стероидсекреторных клетках липидные включения. У молоди близкородственных кижучу горбуши, кеты и сима [1] липидные включения обнаружены не были. Не выявили мы их и в опытах на горбуше, представленных в настоящей работе. Можно было предположить, что эта особенность связана с тем, что молодь данного вида была выращена в лабораторных условиях. Однако у молоди горбуши, выращенной как в лабораторных, так и в естественных условиях, липидных включений мы не обнаружили. По всей видимости наличие липидов в СК молоди кижуча характерно именно для данного вида.

После воздействия эстрадиолом в яичниках подопытных самок снизилась активность СК в составе теки. Одновременно в цитоплазме СК, локализованных в строме яичников, появилось большое количество липидных включений, которые у контрольных рыб отсутствовали. При сравнении количественных характеристик видно, что эти клетки не отличаются от СК, содержащих липидные включения в строме семенников контрольных самцов. Необходимо отметить также некоторое повышение активности СК в гранулезе ооцитов в яичниках подопытных самок. Интересно, что при стимуляции



А



Б

Рис. 5. Стероидсекреторные клетки в строме семенника контрольного самца кижуча:

А — группа СК I вида. В цитоплазме видны крупные митохондрии с трубчато-везикулярными кристами (м); я — ядро СК. Ув. $\times 10000$. Б — СК II вида. В цитоплазме содержится большое количество липидных включений (л) и единичные мелкие митохондрии (м). Ув. $\times 12000$. Все условные обозначения как на предыдущих рисунках.

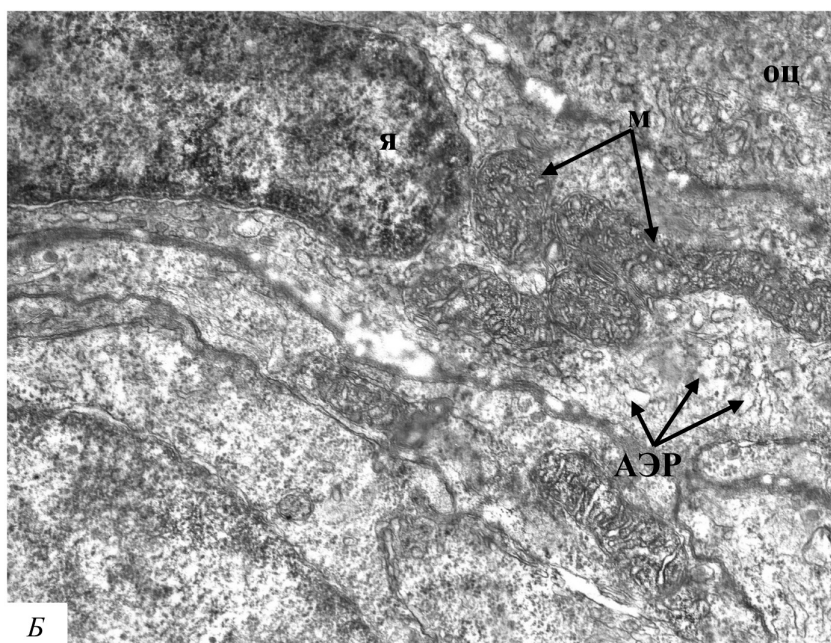
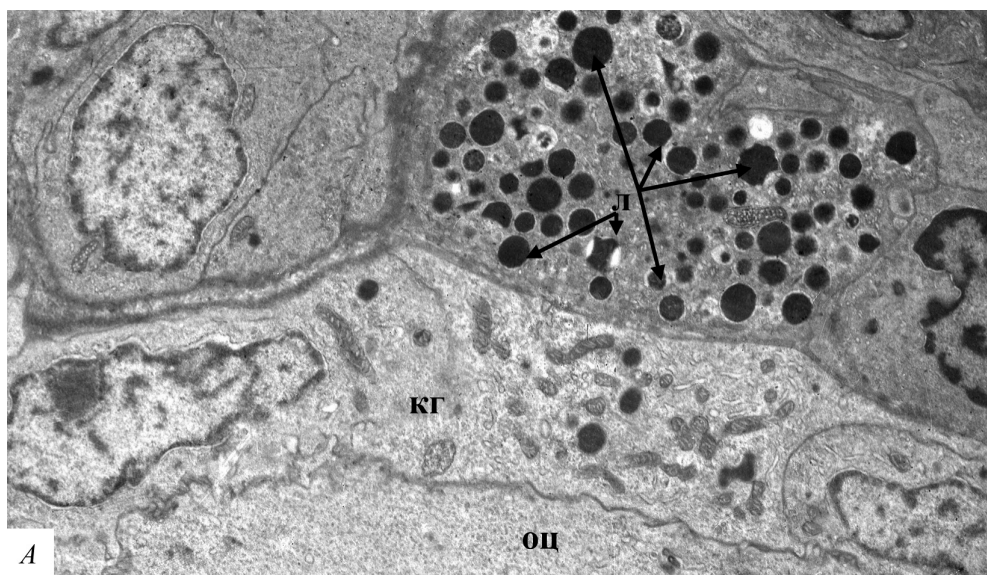


Рис. 6. Стероидсекреторные клетки в составе стромы (А) яичника подопытной самки и гранулезы (Б) фолликула превителлогенного ооцита в гонаде подопытного самца кижуча после индуцированной инверсии пола:

А — в цитоплазме содержится большое количество липидных включений; кг — клетка гранулезы; оц — участок цитоплазмы ооцита. Ув. $\times 4500$. Б — видны крупные митохондрии с трубчато-везикулярными кристами. Ув. $\times 22\,500$. Все условные обозначения как на предыдущих рисунках.

оогенеза эстрадиолом у самок горбуши (опыт 2) происходило хотя и не достоверное снижение активности СК гранулезы.

В семенниках подопытных самцов с появлением превителлогенных ооцитов активные СК обнаруживали в составе гранулезы, а из стромальных СК остались только СК с липидными включениями. Клетки второго типа, выявленные у контрольных рыб, с крупными митохондриями и хорошо развитой агранулярной эндоплазматической сетью в строме гонад подопытных самцов отсутствовали. Такая же локализация активных СК в составе гранулезы превителлогенных ооцитов в гонадах подопытных самцов ранее была отмечена и у горбуши (опыт 2).

Таким образом, при воздействии эстрадиолом у самок кижуча происходило подавление оогенеза, которое сопровождалось снижением стероидогенной активности в теке фолликулов превителлогенных ооцитов и ее повышением в строме. В семенниках же подопытных самцов наблюдалась инициация оогенеза. При этом активные СК обнаруживали в составе фолликулярной оболочки превителлогенных ооцитов, а число и активность СК в строме семенников достоверно снижались.

Обсуждение результатов исследования

Перед тем как рассмотреть особенности реакции стероидсекреторных клеток на гормональное воздействие, кратко подытожим полученные данные, отдельно рассмотрим состояние СК у самок и самцов.

В первом опыте воздействие тестостерона пропионата привело к уменьшению числа ооцитов и снижению темпа их роста у самок горбуши. При этом активность СК в составе теки фолликулов у подопытных рыб была ниже, а в строме яичников, наоборот, выше, чем у контрольных. Таким образом снижение темпа роста ооцитов сопровождалось смещением стероидогенной активности из их оболочек в строму яичников. Во втором и в третьем опытах экзогенный эстрадиол к моменту фиксации не оказал видимого влияния на оогенез самок горбуши. Активность СК, локализованных в фолликулярных оболочках, судя по их ультраструктурной организации, не изменилась, а в строме гонад повысилась. Об этом можно было судить по значительному увеличению либо числа СК (опыт 2), либо размеров как самих клеток, так и органоидов (опыт 3). В четвертом опыте, проведенном на молоди кижуча, экзогенный эстрадиол способствовал уменьшению числа ооцитов и снижению темпа их роста. При этом активность СК в составе оболочек ооцитов у подопытных рыб существенно понизилась. Наиболее заметным было снижение активности СК, локализованных в теке фолликулов; у некоторых особей эти клетки здесь вообще не выявлялись. В отличие от этого активность СК в строме яичников у самок во всех опытах значительно возросла.

Таким образом, по итогам проведенной работы мы можем сделать два принципиальных вывода.

1. Поскольку у всех подопытных самок активизировались СК, локализованные в строме яичников, то изменение стероидогенной активности при гормональном воздействии осуществляется в направлении противоположном ее изменению при естественном развитии гонад (из стромы в фолликулярные оболочки).

2. Во всех опытах независимо от применяемого гормона, срока и способа воздействия, если гормональное воздействие приводило к сокращению числа ооцитов и снижению темпа их роста, наблюдали понижение уровня стероидогенной активности,

поскольку повышение активности СК в строме гонад сопровождалось понижением их активности в фолликулярных оболочках. Если состояние фонда ооцитов у контрольных и подопытных рыб было сходным, понижения уровня стероидогенной активности при гормональном воздействии не происходило. В этом случае при повышении активности СК в строме гонад, активность СК, локализованных в теке и гранулезе, фактически не изменялась.

Данные о локализации и активности СК в яичниках молоди исследованных видов рыб при естественном развитии гонад и гормональном воздействии позволяют составить представление об их возможной роли в регуляции некоторых процессов раннего гонадогенеза. Эстрогенизация приводит к стимуляции СК в строме и подавлению СК в фолликулярных оболочках. Это может быть опосредовано гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системой через стимуляцию синтеза андрогенов стероидсекреторными клетками, расположенными в строме, которые в свою очередь тормозят дифференцировку ооцитов и СК в фолликулярных оболочках. Это предположение подтверждают результаты комплексных исследований гонад, секреторных клеток и содержания половых стероидных гормонов в крови осетровых. Так, при сравнении состояния СК в яичниках самок молоди стерляди с разной концентрацией половых гормонов в плазме крови оказалось, что чем выше была концентрация тестостерона, тем меньшее число СК обнаруживалось в составе теки фолликулов превителлогенных ооцитов, а у самки стерляди с самым большим содержанием тестостерона в плазме крови (22,5 нг/мл) СК были расположены только в строме яичника [17].

Инъекция тестостерона пропионата в первом опыте не оказала влияния на ход развития гонад у генотипических самцов горбуши. Однако СК у подопытных рыб можно было видеть не в эпителии, как у контрольных, а преимущественно в строме семенников, что наблюдается в гонадах с более продвинутой стероидсекреторной функцией. Во втором опыте инъекция эстрадиола дипропионата предотвратила естественную инверсию пола у самцов горбуши и стимулировала развитие ооцитов. При этом активные СК у подопытных рыб присутствовали преимущественно в гранулезе ооцитов, тогда как активность СК в строме гонад была значительно ниже.

В третьем опыте на горбуше и четвертом опыте на кижуче экзогенный эстрадиол стимулировал у самцов феминизацию половых желез и индуцировал формирование фонда ооцитов. В ходе этого процесса первоначально значительно повышалась активность СК в строме гонад, а с появлением превителлогенных ооцитов — и в их гранулезе.

По совокупности всех полученных данных мы видим, что в ходе индуцированного экзогенным эстрадиолом появления ооцитов периода ранней профазы мейоза возрастала активность СК, локализованных в строме гонад. С появлением превителлогенных ооцитов активные СК располагались уже в составе гранулезы. При этом активность СК в строме достоверно снижалась. Таким образом, развитие стероидогенной системы в инвертированных гонадах подопытных самцов происходило так же, как в яичниках у интактных самок.

Литература

1. Мосягина М. В., Зеленников О. В. Стероидсекреторные клетки в гонадах у молоди тихоокеанских лососей перед выпуском с рыбоводных заводов // Вопросы ихтиологии. 2006. Т. 46, № 2. С. 272–277.
2. Федоров К. Е., Зубова С. Э., Семенов В. В., Бурлаков А. Б. Стероидсекреторные клетки в гонадах молоди стерляди *Acipenser ruthenus* L. в период дифференцировки пола // Вопр. ихтиол. 1990. Т. 30, вып. 1. С. 65–75.
3. Devlin R. H., Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences // *Aquaculture*. 2002. Vol. 208. P. 191–364.
4. Nakamura M., Kobayashi T., Chang X.-T., Nagahama Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish // *J. Exp. Biol.* 1998. Vol. 281. P. 362–372.
5. Van den Hurk R., Lambert J. G. D., Peute J. Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry (*Salmo gairdneri*) before and after the onset of gonadal sex differentiation // *Reprod. Nutr. Develop.* 1982. Vol. 22, N 2. P. 413–425.
6. Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб: Наука, 1994. 400 с.
7. Lofts B., Bern H. B. The functional morphology of steroidogenic tissue // *Steroids in nonmammalian vertebrates* / ed. by D. R. Idler. New York: Academic Press, 1972. P. 37–125.
8. Васильева Е. В. Влияние гипофизэктомии, гормональных и солевых воздействий на функцию интерреналовой железы осетровых: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: ЛГУ, 1983. 18 с.
9. Киселева Е. В., Шилов А. Г., Христолюбова Н. Б. Методы оценки основных стереологических параметров // *Применение стереологических методов в цитологии* / под ред. А. Д. Груздева. Новосибирск, 1974. С. 33–54.
10. Weibel E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology // *Internat. Rev. Cytol.* 1969. Vol. 26. P. 235–302.
11. Федоров К. Е., Зеленников О. В. Дифференцировка пола у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum. Роль онтогенетических факторов и влияние экзогенного тестостерона // *Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3*. 2009. Вып. 3. С. 111–121.
12. Мосягина М. В., Кузнецова И. В., Зеленников О. В., Гарлов П. Е. Морфофункциональный анализ состояния стероидсекреторных клеток гонад молоди горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum)) в норме и при воздействии эстрадиолом // *Цитология*. 2003. Т. 45, № 5. С. 450–455.
13. Арбузова Л. Л. Морфофункциональная характеристика клеток Лейдига семенников горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* в период нерестовой миграции // *Морфология*. 1995. Т. 108, № 3. С. 72–75.
14. Федоров К. Е., Сабанова Е. В., Лунев Г. Е., Зеленников О. В. Гистофизиологический и экспериментальный анализ онтогенетических и гормональных механизмов дифференцировки пола у протогиниста горбуши // *Тез. симп. «Экологические и функциональные основы адаптации гидробионтов»*. 2000 г. С. 36–37.
15. Zelennikov O. V., Fedorov K. E., Lunev G. E. Effect of sex steroid hormones on gametogenesis of pink salmon in the period of sex differentiation // *Tez. 21st conference of European comparative endocrinologist*. 2002. P. 202.
16. Лунев Г. Е., Федоров К. Е., Зеленников О. В. Влияние экзогенного эстрадиола на развитие гонад горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum: обработка молоди после дифференцировки пола // *Вестн. С.-Петерб. ун-та*. 2007. Сер. 3. 2007. Вып. 3. С. 11–22.
17. Мосягина М. В. Развитие стероидсекреторных клеток в гонадах круглоротых и рыб в раннем онтогенезе: дис. канд. ... биол. наук. Санкт-Петербург, 2006. 227 с.

Статья поступила в редакцию 7 июня 2010 г.