

УКД 591.1:591.463.1:576.3

МНОГОЯДЕРНЫЕ КЛЕТКИ В СПЕРМАТОГЕННОМ ЭПИТЕЛИИ МИДИИ ГРЕЯ

Масленникова Л.А., Божко Г.Г.

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России»,
Владивосток, e-mail: lamas51@mail.ru

Гаметогенез является индикатором состояния организма. В течение года изучали клеточный состав семенных фолликулов двустворчатого моллюска мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*). Использовали методы световой и электронной микроскопии. Установлено, что в семенниках мидии встречаются многоядерные сперматогонии второй и последующих генераций с частотой около 2%. В группе первичных сперматогониев многоядерность не отмечалась. У старых моллюсков наблюдается гермафродитизм, то есть в разных фолликулах может идти сперматогенез или овогенез с преобладанием структуры семенника. Такие явления наблюдаются при нарушении гормональной регуляции. На фоне этих нарушений рассматривали стадию размножения сперматогониев и каких-либо отклонений в сторону увеличения многоядерности не выявлено. Было достоверно доказано, что в семенниках мидии Грея отмечается многоядерность не только в сперматогониях, но и клетках других генераций сперматогенеза.

Ключевые слова: двустворчатые моллюски, сперматогенез, многоядерные половые клетки, регуляция сперматогенеза

MULTINUCLEATED CELLS IN THE SEMINIFEROUS EPITHELIUM OF CRENOMYTILUS GRAYANUS

Maslennikova L.A., Bozhko G.G.

Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: lamas51@mail.ru

The gametogenesis is an indicator of the body condition. The cellular structure of the seed follicles bivalve mollusk mytilus Gray (*Crenomytilus grayanus*) had been studied during the year. Techniques used were light and electron microscopy. It is found that in the testes of mussels contain multinucleated spermatogonia of second and subsequent generations with a frequency of about 2%. In a primary spermatogonia group multinucleation was not observed. Hermaphroditism was observed in old mollusks, thus, spermatogenesis or oogenesis can occur in the follicles with a predominance of the structure of testis. Such phenomena observed in violation of the hormonal regulation. Against the background of these violations, stage of reproduction of spermatogonia was considered. As a result, there were no any deviations towards multicore revealed. It was proved that in the testes of mussels Gray multinucleation is present not only in the spermatogonia, but also in the cells of other generations of spermatogenesis.

Keywords: bivalves, spermatogenesis, multinucleated germ cell, regulation of spermatogenesis

Сперматогенез является индикатором состояния организма. Многоядерные клетки в сперматогенезе у беспозвоночных встречается намного шире, чем нам известно [1, 9] так как отдельно ими не занимаются. Многоядерность описывают как исключительный случай при изучении сперматогенеза [6, 9]. Выявление причины возникновения многоядерности клеток сперматогенного ряда и механизмов её появления очень важно, потому что у некоторых беспозвоночных животных наблюдается несколько типов сперматозоидов, которые отличающихся один от другого. Ранее была отмечена многоядерность сперматогенного эпителия у анадарты Броутона [5].

У млекопитающих при нарушении сперматогенеза увеличивается доля аномальных сперматозоидов, что приводит к ограниченной стерильности [2].

Цель настоящего исследования – изучить, встречается ли многоядерность клеток сперматогенного ряда у двустворчатого моллюска мидии Грея (*Crenomytilus*

grayanus), проживающего в чистых акваториях залива Петра Великого Японского моря бухты Лазурная.

Материалы и методы исследования

Изучали состояние семенников двустворчатого моллюска мидии Грея на протяжении года. Кусочки половой железы (гонады) размером 0,5 см фиксировали жидкостью Буэна, спир-уксусной кислотой, спирт-пикриновой кислотой (3:1). По обычной методике заливали в парафин, срезы 5 мкм окрашивали гематоксилином с эозином и железным гематоксилином. Морфометрические исследования проводили на серийных парафиновых срезах семенных фолликулов, просчитывали количество многоядерных сперматогониев на 1000 сперматогониев типа В разной генерации; многоядерных сперматоцитов I и II порядка на 1000 сперматоцитов I и II порядка в фолликулах четырех периодов репродуктивного цикла:

1) размножения, в котором проходит митотическое деление сперматогониев В,

2) роста и созревания, в которых проходит мейоз с образованием сперматоцитов I и II порядков,

3) формирования, в котором идет спермиогенез.

Для распознавания сперматид, предпочтение отдавали реактиву Шиффа по Мак Манусу. Для электронно-микроскопического исследования кусочки семенников фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, приготовленного на 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,8, содержащем 0,5% растворе нейтрального формалина, 17% сахарозы, при температуре 4°C в течение двух часов. Дофиксацию проводили 1% раствором четырехоксида осмия на фосфатном буфере, содержащем 27% сахарозы, в течение одного часа. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации кусочки заливали в эпон 812. Ультратонкие срезы контрастировали 2% уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали и фотографировали на электронном микроскопе. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашенные метиленовым синим, использовали для диагностики клеточных типов сперматогенеза.

Результаты исследования и их обсуждение

Мидия Грея (*Crenomytilus grayanus*) – двусторчатый моллюск, предпочитает чистые морские акватории без видимых нефтяных загрязнений. Сперматогенез у мидии проходит в фолликулах (пузырьках), которые являются структурной и функциональной единицей половой железы (гонады). Стенка фолликула выстлана вспомогательными клетками. Цитоплазматические выросты вспомогательных клеток образуют компартиментализацию сперматогенных клеток разных генераций. Ближе к стенке фолликула располагаются сперматогонии типа А. Это крупные клетки около 8 мкм в диаметре, со светлым ядром и тонким ободком цитоплазмы; в них редко встречаются митозы. Эти клетки находятся в половых фолликулах на всех стадиях полового цикла. Многоядерных клеток среди них не встречается.

Сперматогонии типа В – активно делящиеся митозом клетки. Ядра этих клеток более плотные по сравнению с ядрами сперматогониев типа А и размеры их немного меньше до 7 – 6 мкм. Отростки вспомогательных клеток отделяют сперматогонии типа А от сперматогониев типа В, кроме этого последние располагаются несколько дальше от стенки фолликула к центру, таким образом топографически и морфологически эти два типа сперматогониев хорошо отличаются друг от друга.

Морфометрически многоядерные сперматогонии типа В просчитывали в период

размножения, периоды роста и созревания репродуктивного цикла, а в период формирования количество вторичных сперматогониев единично и многоядерность среди них отсутствует (таблица).

В первые три периода около 2% сперматогониев типа В имеют два ядра, четырехядерные сперматогонии встречаются единично. В периоды роста и созревания, формирования репродуктивного цикла просчитывали долю многоядерных сперматоцитов. Среди сперматоцитов I и II порядков встречается около 1,5% многоядерных, чаще двуядерных клеток (таблица).

Многоядерные сперматогонии типа В и сперматоциты I и II порядков по структуре цитоплазмы и ядра не отличаются от одноядерных. Какие либо дегенеративные изменения, такие как: базофилия цитоплазмы, грубая конденсация хроматина, явления кариорексиса, нарушения в строении диктиосом аппарата Гольджи, вздутие крист митохондрий не наблюдались.

В период формирования, на полутонких срезах можно диагностировать двух и четырехядерные сперматиды, в которых идет спермиогенез. Изучая полутонкие срезы (толщиной 1 мкм) фолликулов перед нерестом, можно видеть, как из единой цитоплазмы дифференцируются самостоятельные два, четыре сперматозоида. Морфологически сперматозоиды, которые образовались из многоядерных сперматид не отличались от сперматозоидов – из одноядерных.

У старых моллюсков мидии Грея иногда наблюдается гермафродитизм, то есть встречаются фолликулы со сперматогенезом или овогенезом в одной гонаде, где преобладает морфология семенников (4). При микроскопическом анализе семенников гермафродитных особей, явно имеющих сбой гормональной регуляции, увеличение многоядерности клеток сперматогенного ряда не отмечалось по отношению к норме.

В гонаде мидии Грея частота встречаемости многоядерных клеток сперматогенного ряда не большая, не более 1,5 – 2%. Единичные случаи многополюсных митозов, подтверждают, то что в многоядерных сперматогониях типа В не нарушаются дальнейшие периоды митотического цикла и процесс пролиферации идет в той же последовательности, как и у одноядерных половых клеток. Отсутствие восьми и более ядерных сперматид подтверждает возможность нормального цитокинеза у многоядерных сперматогониев и сперматоцитов. Электронно-микроскопические исследования показывают, что одноядерные и многоядерные сперматиды отличаются друг от друга только количеством ядер.

Количество многоядерных сперматогенных клеток в фолликулах гонады мидии Грея разных периодах репродуктивного цикла

сперматогенные клетки	период размножения	периоды роста и созревания	период формирования
сперматогонии типа В	20 ± 0,81	19 ± 0,75	–
сперматоциты I порядка	–	15 ± 0,61	14 ± 0,82
сперматоциты II порядка	–	16 ± 0,79	15 ± 0,98

После нереста в просветах фолликулов семенников появляются амебоциты, в цитоплазме которых видны не выметанные сперматозоиды, такая резорбция в фолликулах после нереста является нормой для двустворчатых моллюсков. Однако при ультраструктурном исследовании мы не встречали в фагосомах амебоцитов многоядерных сперматогониев, сперматоцитов и сперматид.

Исследования по влиянию кадмия и фенола на сперматогенные и вспомогательные клетки морских ежей *Strongylocentrotus nudus* и *Anthocardaris crassispina* показали отсутствие многоядерности сперматогенных клеток в контроле, то есть в норме, однако в гонаде ежей, подвергнутых действию фенола, отмечаются четырех ядерные сперматиды и двужядерные сперматозоиды, нарушение крист митохондрий сперматогониев и сперматоцитов [6]. Ультраструктурные исследования амебоцитов и их функция в семенниках морских ежей под действием токсикантов окружающей среды, показали усиление активности аппарата Гольджи и исчезновение зародышевой плазмы в сперматогония [7, 8].

Отсутствие конгломератов половых клеток, которые встречаются у мидии японской (двустворчатого моллюска) [4], морфологически нормальные сперматозоиды мидии, образующиеся из двух или четырех ядер-

ных сперматид, отсутствие дегенерации многоядерных сперматогенных элементов, доказывают, что механизм повреждения цитокинеза, не передается дочерним клеткам сперматогенного ряда самцов мидии Грея.

Список литературы

1. Данилова Л.В. Сперматогенез и его регуляция. – М., 1983. – 269 с.
2. Зенкина В.Г., Каредина В.С., Солодкова О.А. Морфология яичников андрогенизированных крыс на фоне приема экстракта из кукумарии // ТМЖ. – 2007. – № 4. – С. 70–72.
3. Масленникова Л.А. Влияние пептидного «морфогена» гидры на сперматогенез приморского гребешка // Известия ТИНРО. Владивосток. – 2000. – № 127. – С. 108–112.
4. Масленникова Л.А. Сперматогенез двустворчатых моллюсков: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Владивосток, 1985. – 20 с.
5. Масленникова Л.А. Многоядерность сперматогенного эпителия двустворчатых моллюсков // Журнал Успехи современного естествознания. – 2014. – № 12 (часть 2) – С. 39–40.
6. Юрченко О.В. Влияние фенола и кадмия на сперматогенные и вспомогательные клетки морских ежей *Strongylocentrotus nudus* и *Anthocardaris crassispina*: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Владивосток, 2004. – 20 с.
7. Reunov A.A., Yurchenko O.V., Kalachev A.V., Au D.W.T. An ultrastructural study of phagocytosis and shrinkage in nutritive phagocytes of the sea urchin *Anthocardaris crassispina* // Cell tissue Res. – 2004. – V. 318. – P. 419–428.
8. Reunov A.A., Kalachev A.V., Yurchenko O.V., Au D.W.T. Selective resorption in nutritive phagocytes of the sea urchin *Anthocardaris crassispina* // Zygote. – 2004. – V. 12. – P. 71–73.
9. Roosen-Runge E.C. The process of spermatogenesis in animalis. // Biol. Revs. – 1962. – Vol. 37. – P. 343–377.