

Промысловые виды и их биология

УДК 599.742.47

Морфофункциональные изменения семенников у каланов в постнатальном онтогенезе*Е.А. Болтнев¹, П.М. Торгун², А.И. Болтнев¹*

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»), г. Москва

² Государственный аграрный университет имени императора Петра I (ФГБОУ ВО «ВГАУ»), г. Воронеж

Проведён гистологический анализ семенников, пробы тканей которых взяты от свежих трупов 18 каланов в возрасте от одного месяца до двух лет в период массовой гибели на острове Беринга в 1991–1995 гг. Семенники фиксировали в жидкостях Штыве, Буэна. Материал заливали в парафин. Срезы, толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, азаном по Гейденгайну, по методу трихром- и тетрахром-ШИК. В качестве показателей развития сперматогенного эпителия использовали морфометрические характеристики: с помощью винтового окуляра-микрометра измеряли диаметр семенных канальцев, диаметр ядер сперматогенных клеток, определяли площадь ядер sustentоцитов и интерстициальных эндокриноцитов, а также определяли численность sustentоцитов в одном поперечном срезе семенного канальца. Проведённые исследования позволили выявить активный сперматогенез в семенниках каланов в возрасте двух лет. У этих каланов диаметр семенных канальцев достигает максимальной величины, извитые семенные канальцы содержат все сперматогенные клетки, включая сперматозоиды. Sustentоциты и интерстициальные эндокриноциты характеризуются признаками высокой функциональной активности.

Ключевые слова: калан, постнатальный онтогенез, возраст полового созревания, сперматогенез, sustentоциты, эндокриноциты.

DOI: 10.36038/2307-3497-2019-178-77-83

ВВЕДЕНИЕ

Калан или морская выдра — вид, занесённый в Красную книгу Российской Федерации. В настоящее время многие исследователи считают его численность восстановленной. На Командорских островах после переселения с острова Медного на остров Беринга он достиг своей максимальной численности в середине 1980-х годов, а к 1990-м годам полностью освоил прибрежную акваторию острова Беринга.

В научной литературе исследований репродуктивного цикла каланов немного. Так, ранее на основании анализа акросомической структуры сперматид у каланов в световом микроскопе после применения ШИК-реакции было выделено 16 этапов спермиогенеза, 12 из которых использованы для идентификации 12 стадий цикла сперматогенного эпителия [Торгун, Горшкова, 2010]. Были исследованы так же электронно-микроскопические особенности сперматид у каланов

в постнатальном онтогенезе [Торгун и др., 2011]. В отечественной и зарубежной литературе отсутствуют исследования, касающиеся возрастной морфологии семенников у каланов.

Целью настоящего сообщения является изучение морфофункциональных показателей семенников в постнатальном онтогенезе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Гистологический материал был взят на острове Беринга в период массовой гибели каланов в 1991–1995 гг. от свежих погибших 18 каланов в возрасте от одного месяца до двух лет, из которых 30 дневных — 4 калана; 5–7 месячных — 4 калана; годовиков — 5 каланов и двухлеток — 5 каланов.

Семенники фиксировали в жидкостях Штыве, Буэна. Материал заливали в парафин. Срезы, толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, азаном по Гейденгайну, по методу трихром- и тетрахром-ШИК.

Определяли численность различных типов семенных канальцев (по 100 канальцев для каждого животного), с помощью винтового окуляра-микрометра измеряли диаметр семенных канальцев, а так же диаметр ядер сперматогенных клеток (по 100 измерений для каждого животного). Определяли площадь ядер сустентоцитов и интерстициальных эндокриноцитов (возраст каланов 12 и 24 месяца; по 100 измерений для одного животного). Ядра сустентоцитов имели различную форму и поэтому площадь ядер этих клеток вычисляли с помощью планиметра ПП-2К (50 ядер для каждого животного). Определяли численность сустентоцитов в одном поперечном срезе семенного канальца (100 канальцев для каждого животного).

Статистическую обработку материала проводили с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента и непараметрического *T*-критерия Уайта [Лакин, 1980; Урбах, 1964]. Результаты измерения диаметра ядер обрабатывали с помощью *t*-критерия Стьюдента, так как в этих случаях распределения удовлетворяли двум обязательным условиям применения этого критерия: распределения в группах сравнения подчинялись нормальному закону распре-

деления и имели равные генеральные дисперсии. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Колмогорова — Смирнова и поправки Лиллиефорса. Для количественных показателей (количество сустентоцитов и сперматогенных клеток), распределения которых отличались от нормального, был использован непараметрический *T*-критерий Уайта. Результаты измерений представлены в виде выражения $M \pm m$, где *M* — средняя арифметическая величина и *m* — стандартная ошибка средней арифметической. Различия между средними показателями сравниваемых групп рассматривались статистически значимыми при уровнях значимости $p < 0,05$ или $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У каланов в возрасте 30 дней в семеннике выявляются в основном канальцы, содержащие единичные стволовые сперматогонии A_0 и многочисленные сустентоциты (рис. 1). В извитых семенных канальцах полость отсутствует. Средний диаметр семенных канальцев составляет $99,1 \pm 1,20$ мкм. Сперматогонии имеют округлую форму, светлую цитоплазму и крупное светлое ядро, расположенное в центре клетки. Средний диаметр ядер сперматогоний составляет $11,1 \pm 0,26$ мкм. Сперматогонии в основном располагаются на базальной мембране канальцев, однако единичные более крупные сперматогонии можно встретить в центре канальцев.

Детальные исследования Л.И. Фалина [1968] показали, что в гоноцитах при окраске PAS выявляется большое количество гликогена, окрашивающегося в ярко-красный цвет. С наступлением дифференцировки гоноцитов и превращением их в сперматогонии, они теряют запасы гликогена и дают отрицательную реакцию на гликоген. По данным Л.И. Фалина часть гоноцитов в семенниках человека превращается в сперматогонии не раньше 20-й недели, и многие гоноциты в половых железах выявляются даже к моменту рождения.

У каланов в возрасте 5–7 месяцев в семенных канальцах присутствуют сустентоциты, сперматогонии, а также сперматоциты первичные ранние (лептотенные, зиготен-

ные) и сперматоциты пахитенные (рис. 2). Обращает на себя внимание появление полости в извитых семенных канальцах. Диаметр семенных канальцев увеличивается до $146,6 \pm 2,31$ мкм (различия по сравнению с предыдущей возрастной группой статистически значимы $p < 0,001$). Следует отметить так же, что численность sustentоцитов значительно уменьшается и в первом ряду сперматогенных клеток присутствуют сперматогонии, сперматоциты лептотенные и зиготенные. Во втором ряду сперматогенных клеток обнаружены сперматоциты первичные в стадии пахитемы (рис. 2). Однако многие извитые семенные канальцы содержат только один ряд клеток, включающих сперматогониальные стволовые клетки (ССК), сперматогонии парные (A_{pr}), сперматогонии групповые (A_{pl}), сперматогонии дифференцирующиеся (A_{1-4}), сперматогонии промежуточные и типа В. В этом же ряду присутствуют сперматоциты прелептотенные, лептотенные и зиготенные.

Сперматогонии у каланов в возрасте 5–7 месяцев резко отличаются от сперматогоний у каланов в возрасте 30 дней. Они имеют меньшие размеры, их ядра овальные или округлые, их средний диаметр — $8,65 \pm 0,16$ мкм (различия по сравнению с предыдущей возрастной группой статистически значимы $p < 0,001$). По-видимому, у каланов в возрасте 30 дней в семенниках ещё не завершилось превращение гоноцитов в сперматогонии, хотя все сперматогонии у этих животных не содержат в своей цитоплазме включений гликогена, что является характерным признаком гоноцитов.

Сперматогониальные стволовые клетки (ССК) обозначаются ещё как сперматогонии изолированные. Эти клетки располагаются самостоятельно непосредственно у базальной мембраны семенного канальца, и они не связаны с другими сперматогенными клетками цитоплазматическими мостиками. Сперматогониальные стволовые клетки (ССК) делятся и образуют спаренные клетки, соединённые цитоплазматическими мостиками. Сперматогонии А-спаренные делятся митотически и образуют групповые сперматогонии, которые превращаются в диффе-

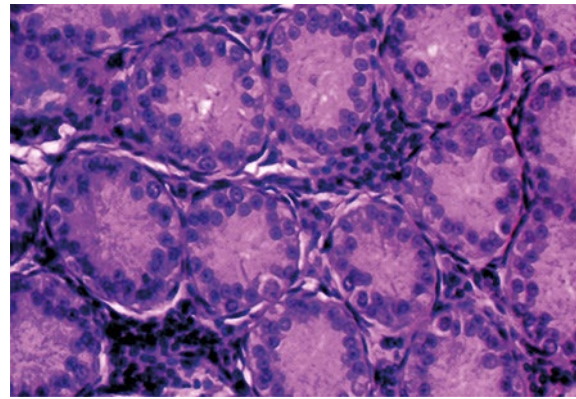


Рис. 1. Семенник калана в возрасте 30 дней. Выявляются канальцы, содержащие единичные стволовые сперматогонии и многочисленные sustentоциты. В извитых семенных канальцах полость отсутствует. Фиксация: жидкость Штыве; окраска: гематоксилин-эозин. Ув. об. 20, ок. 15

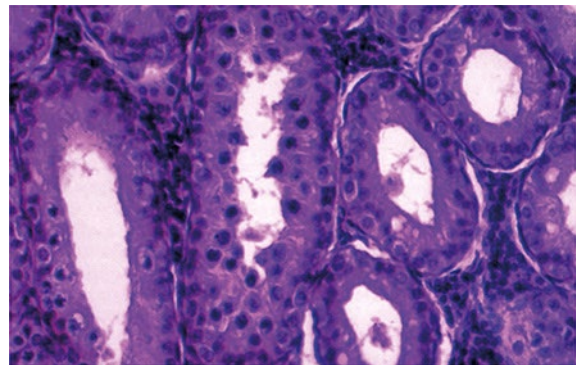


Рис. 2. Семенник калана в возрасте 5–7 месяцев. В семенных канальца хорошо выражена полость, присутствуют sustentоциты, сперматогонии, а так же сперматоциты первичные ранние (лептотенные, зиготенные) и пахитенные. Фиксация: жидкость Штыве; окраска: гематоксилин-эозин. Ув. об. 20, ок.15

ренцирующиеся сперматогонии A_1-A_4 , далее в сперматогонии промежуточные и типа В. В результате митотического деления сперматогоний типа В образуются сперматоциты 1 порядка, вступающие в период роста. Следует отметить, что определение различных типов сперматогоний очень затруднительно даже в электронном микроскопе.

Сперматоциты первичные молодые (лептотенные и зиготенные) всегда располагаются в первом ряду сперматогенных клеток. Особенно легко определить сперматоциты первичные в стадии зиготены. Известно, что в этой стадии происходит спаривание гомо-

логичных хромосом, образуются биваленты. Спаренные хромосомы приобретают форму вытянутой петли, прикреплённой своими концами к ядерной оболочке, и ядра в этот период принимают характерную букетную конфигурацию. Некоторые авторы сравнивают форму ядра зиготенных сперматоцитов с формой парашюта.

У каланов в возрасте 12 месяцев (рис. 3) средний диаметр извитых семенных канальцев увеличивается до $195,0 \pm 1,82$ мкм (различия по сравнению с предыдущей возрастной группой статистически значимы $p < 0,001$). В семенниках преобладают извитые семенные канальцы, в которых появляются ранние округлые сперматиды (ОС). Извитые семенные канальцы с удлинёнными спер-

матидами (УС) встречаются в небольшом количестве. Канальцы со сперматозоидами отсутствуют.

У каланов в возрасте двух лет средний диаметр извитых семенных канальцев достигает максимальной величины и составляет $202,8 \pm 2,21$ мкм (различия по сравнению с предыдущей возрастной группой статистически значимы $p < 0,001$). В семенниках представлены канальцы, в которых содержатся все сперматогенные клетки, включая сперматозоиды (рис. 4).

Проведённые кариометрические исследования 10 типов сперматогенных клеток у каланов различного возраста показали (табл. 1), что средний диаметр ядер сперма-

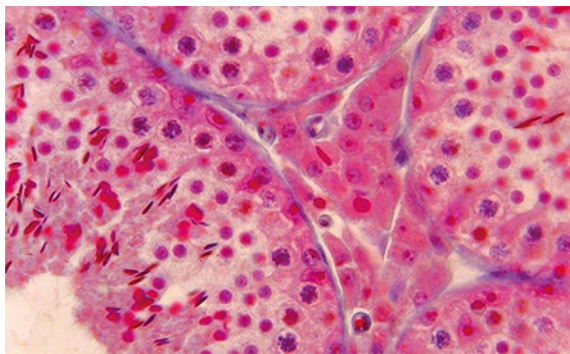


Рис. 3. Семенник калана в возрасте 12 месяцев. Семенные канальцы содержат округлые сперматиды (справа) и удлинённые (слева). Фиксация: жидкость Штыве; окраска: азан по Гейденгайну. Ув. об. 40, ок. 15

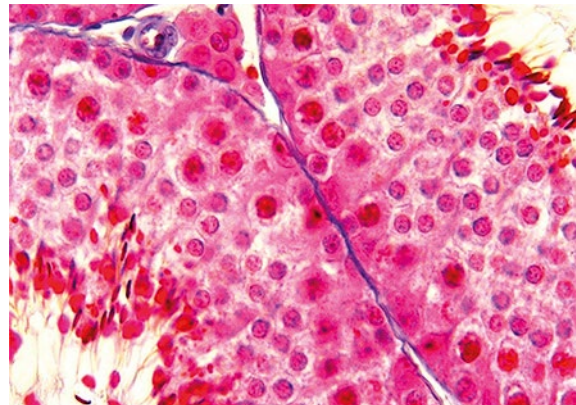


Рис. 4. Семенник калана в возрасте 24 месяцев. В канальцах содержатся все сперматогенные клетки, включая сперматозоиды. Фиксация: жидкость Штыве; окраска: азан по Гейденгайну. Ув. об. 40, ок. 15

Таблица 1. Кариометрические показатели сперматогенных клеток яичек у каланов разного возраста

№	Клетки	Диаметр ядер клеток (мкм)	
		М ± м	
		12месяцев	24 месяца
1	Сперматогонии стволовые	$7,88 \pm 0,16$	$7,92 \pm 0,19$
2	Сперматогонии A_{1-4}	$7,43 \pm 0,15$	$7,47 \pm 0,17$
3	Сперматогонии Пр	$7,34 \pm 0,17$	$7,44 \pm 0,16$
4	Сперматогонии типа В	$7,56 \pm 0,15$	$7,66 \pm 0,17$
5	Сперматоциты I лептотенные	$7,79 \pm 0,14$	$7,73 \pm 0,19$
6	Сперматоциты I зиготенные	$8,70 \pm 0,13$	$8,75 \pm 0,14$
7	Сперматоциты I пахитенные	$10,32 \pm 0,1$	$10,33 \pm 0,17$
8	Сперматоциты I диплотенные	$10,46 \pm 0,18$	$10,48 \pm 0,15$
9	Сперматоциты II	$7,21 \pm 0,21$	$7,23 \pm 0,25$
10	Сперматиды круглые	$7,16 \pm 0,32$	$7,19 \pm 0,36$

Таблица 2. Кариометрические показатели сустентоцитов и интерстициальных эндокриноцитов у каланов разного возраста

Показатели	Возраст каланов	
	12 месяцев	24 месяца
Количество сустентоцитов ***	13,2	12,8**
Площадь ядер сустентоцитов	44,2±0,45	56,2±0,38*
Площадь ядер интерстициальных эндокриноцитов	34,2±0,26	39,6±0,29*

* P <0,001 (t-критерий Стьюдента).

** P >0,05 (непараметрический T-критерий Уайта).

*** Среднее количество клеток на один поперечный срез канальца.

тогенных клеток у каланов в возрасте 24 месяцев по сравнению с каланами в возрасте 12 месяцев не изменяется. Различий статистически значимых не выявлено.

При изучении кариометрических показателей сустентоцитов и интерстициальных эндокриноцитов (табл. 2) у каланов различного возраста обнаружено статистически значимое увеличение площади ядер этих клеток у каланов в возрасте двух лет по сравнению с каланами в возрасте одного года, при этом численность сустентоцитов не изменяется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, активный сперматогенез в семенниках каланов выявлен у животных в возрасте двух лет. У этих каланов диаметр семенных канальцев достигает максимальной величины, извитые семенные канальцы содержат все сперматогенные клетки, включая сперматозоиды. Сустентоциты и интерстициальные эндокриноциты характеризуются признаками высокой функциональной активности.

ЛИТЕРАТУРА

- Торгун П.М., Горшкова Н.А. 2010. Цикл сперматогенного эпителия у калана // Морфология. Т. 137. № 4. С. 191.
- Торгун П.М., Болтнев А.И., Горшкова Н.А. 2011. Электронно-микроскопическое исследование сперматид у северных морских котиков и каланов в постнатальном онтогенезе // Морфология. Т. 140. № 5. С. 55.
- Фалин Л.И. 1968. Развитие половых желёз и происхождение половых клеток в эмбриогенезе человека // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. Т. 54. № 2. С. 3–29.
- Лакин Г.Ф. 1980. Биометрия. М.: Высшая школа. 291 с.
- Урбах В.Ю. 1964. Биометрические методы. М.: Наука. 415 с.

Поступила в редакцию 06.05.2019 г.
Принята после рецензии 29.07.2019 г.

Commercial species and their biology

Morphofunctional changes of the testes in otters in post-natal ontogenesis*E.A. Boltnev¹, P.M. Torgun², A.I. Boltnev¹*¹ Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI «VNIRO»), Moscow, Russia² Emperor Peter I Voronezh state agrarian University (FSBEI HE «VSAU»), Voronezh, Russia

A histological analysis of the testes, whose tissue samples were taken from fresh corpses of 18 sea otter aged from one month to two years in the period of their mass death on Bering Island in 1991–1995, was carried out. Testes were fixed in liquids of Shtiva, Buena. The material was embedded in paraffin. Sections 4–5 µm thick were stained with hematoxylin-eosin, Heidengain's azan, according to the method of trichrome and tetrachrome-CHIC. Morphometric characteristics were used as indicators of the development of spermatogenic epithelium: using a screw eyepiece micrometer, the diameter of the seminiferous tubules, the diameter of the nuclei of spermatogenic cells were measured, the area of the nuclei of sustentocytes and interstitial endocrinocytes was determined, and the number of sustentocytes in a single cross section of the seed canal was determined. Studies have revealed active spermatogenesis in the testicles of sea otter at the age of two years. In these sea otters, the diameter of the seminiferous tubules reaches a maximum; the convoluted seminiferous tubules contain all spermatogenic cells, including spermatozoa. Sustentocytes and interstitial endocrinocytes are characterized by signs of high functional activity.

Keywords: sea otter, postnatal ontogenesis, age of puberty, spermatogenesis, sustentocytes, endocrinocytes.

DOI: 10.36038/2307-3497-2019-178-77-83

REFERENCES

- Torgun P. M., Gorshkova N. A.* 2010. Tsikl spermatogennoy ephiteliya u kalana. [The cycle of the seminiferous epithelium in the sea otters] // *Morfologiya*. T. 137. № 4. S.191.
- Torgun P.M., Boltnev A.I., Gorshkova N.A.* 2011. Ehlektronno-mikroskopicheskoe issledovanie spermatid u severnykh morskikh kotikov i kalanov v postnatal'nom ontogeneze [Electron-microscopic study of spermatids in northern fur seals and sea otters in postnatal ontogenesis] // *Morfologiya*. T. 140. № 5. S. 55.
- Falin L.I.* 1968. Razvitie polovykh zhelez i proiskhozhdenie polovykh kletok v ehmbriogeneze cheloveka [The development of the sex glands and the origin of germ cells in human embryogenesis] // *Arkhiv anatomii, gistologii i ehmbriologii*. T. 54. № 2. S. 3–29.
- Lakin G.F.* 1980. *Biometriya* [Biometrics]. M.: Vysshaya shkola. 291 s.
- Urbakh V. Yu.* 1964. *Biometricheskie metody* [Biometric methods]. M.: Nauka. 415 s.

TABLE CAPTIONS

Table 1. Cariometric indices of spermatogenic cells of the testicles in sea otters of different ages

Table 2. Cariometric indices of sustentocytes and interstitial endocrinocytes in sea otters of different ages

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Testicles of sea otter at the age of 30 days. Tubules containing single stem spermatogonias and numerous sustentocytes are detected. There is no cavity in the convoluted tubule. Fixation: liquid Shtivae; coloring: hematoxylin-eosin. Magnification: lens 20, eyepiece 15.

Fig. 2. Testicles of sea otter at the age of 5–7 months. In the seminiferous tubules the cavity is well expressed, there are sustentocytes, spermatogonia, as well as primary early spermatocytes (leptotenny, zygoteous) and pahitenny. Fixation: liquid Shtivae; coloring: hematoxylin-eosin. Magnification: lens 20, eyepiece 15.

Fig. 3. Testicles of sea otter at the age of 12 months. The seminiferous tubules contain rounded spermatids (right) and elongated (left). Fixation: liquid Shtivae; coloring: azan according to Heidenhine. Magnification: lens 40, eyepiece 15.

Fig. 4. Testicles of sea otter at the age of 24 months. The tubules contain all spermatogenic cells, including spermatozoa. Fixation: liquid Shtiva; coloring: azan according to Heidenhine. Magnification: lens 40, eyepiece 15.