

На правах рукописи

НЕЗНАНОВА Светлана Юрьевна

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГАМЕТОГЕНЕЗА КАМБАЛ  
*HIPPOGLOSSOIDES DUBIUS* И *HIPPOGLOSSOIDES (CLEISTHENES) HERZENSTEINI* В  
СВЯЗИ С ПРОБЛЕМОЙ ИХ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ

03.00.10 – ихтиология

03.00.30 – биология развития, эмбриология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток

2006

Работа выполнена в Дальневосточном государственном университете

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор  
Иванков Вячеслав Николаевич  
доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Реунов Аркадий Анатольевич

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
Долганов Владимир Николаевич  
доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Евдокимов Владимир Васильевич

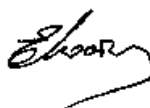
**Ведущая организация** Дальневосточный государственный технический  
рыбохозяйственный университет

Защита состоится « 6 » июня 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета  
Д 005.008.02 при Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу:  
690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им. А.В.  
Жирмунского ДВО РАН

Автореферат разослан « 5 » мая 2006г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Е.Е. Костина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Современный уровень филогенетических исследований в значительной степени сопряжен с применением методов молекулярного анализа, которые привлекают ограниченный объем генетической информации и поэтому не обладают репрезентативностью, достаточной для построения полноценных филогенетических моделей. В соответствии со сформировавшимся мнением многих исследователей наиболее объективным методом современной кладистики является совместное использование нескольких типов филогенетических признаков. Анализ генетического материала – наиболее перспективный метод, должен дополняться привлечением данных, полученных на анатомическом и цитологическом уровнях (Гладышев, Дроздов, 2002). К настоящему времени выяснено, что для суждения о родственных отношениях, филогении и систематике организмов актуально использование строения половых клеток (Иванков, 1987; Дроздов, Иванков, 2000). Как правило, для сравнительного анализа используется строение зрелых гамет – яйцеклеток и сперматозоидов. В последние годы в научной литературе появились данные, согласно которым для таксономического анализа могут привлекаться как оогенные, так и сперматогенные клетки, находящиеся на разных фазах роста и этапах дифференциации. Однако, большая часть исследований в этой области выполнена на гистологическом уровне, возможности которого широки, но не обладают аналитической полнотой ультраструктурного анализа. В данной диссертационной работе впервые продемонстрированы возможности электронной микроскопии, как метода, с помощью которого при исследовании гаметогенеза выявляется целый ряд дополнительных признаков, пригодных для выяснения степени филогенетического родства. Впервые на новой основе изучены некоторые аспекты оогенеза и сперматогенеза двух видов камбаловых рыб, степень филогенетической близости которых является предметом дискуссий. Среди этих аспектов рассматриваются ультраструктурная организация вспомогательных клеток, ультраструктурные особенности формирования желтка и оболочек ооцитов, особенности сперматогенеза и резорбции спермиев. Благодаря ультраструктурному анализу, проведенному в настоящей работе, стало очевидным, что различия могут быть обнаружены не только в строении половых и вспомогательных клеток, но и в механизмах их формирования и функционирования. Сравнительный электронно-микроскопический анализ ультратонких процессов гаметогенеза может быть рекомендован к использованию как новый дополнительный эффективный метод при решении таксономических задач в ихтиологии. Таким образом, впервые в

ихтиологической практике на защиту выносятся филогенетически направленный подход сравнительного анализа ультраструктурных механизмов гаметогенеза.

Цель работы - Продемонстрировать возможность применения сравнительного анализа ультраструктурных особенностей гаметогенеза для выяснения таксономической близости видов на примере камбаловых рыб *H. (Hippoglossoides) dubius* и *H. (Cleisthenes) herzensteini*.

Для осуществления данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать ультраструктурную организацию мужских и женских половых клеток япономорской палтусовидной *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовой *H. (Cleisthenes) herzensteini* камбал.
2. На ультраструктурном уровне исследовать механизмы резорбции сперматозоидов у япономорской палтусовидной и остроголовой камбал.
3. Провести сравнительный ультраструктурный анализ сперматогенеза, оогенеза и вспомогательных клеток япономорской палтусовидной *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовой *H. (Cleisthenes) herzensteini* камбал.

Научная новизна работы. Впервые в ихтиологической практике для сравнительного анализа привлечены особенности ультраструктурных механизмов гаметогенеза. Впервые на ультраструктурном уровне изучен процесс сперматогенеза и оогенеза двух видов камбал - япономорской палтусовидной *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовой *H. (Cleisthenes) herzensteini*. Также впервые изучены процессы посленерестовой резорбции мужских половых гамет у *H. (Hippoglossoides) dubius* и *H. (Cleisthenes) herzensteini*.

Теоретическое и практическое значение работы. Предложенный способ анализа ультраструктурной организации и дифференциации мужских и женских половых клеток в перспективе позволит корректировать и уточнять схемы таксономической иерархии рыб и выяснять родственные отношения между филогенетическими группами и видами.

Апробация работы. Материалы были представлены на IV, VI и VII Региональных конференциях по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии (Владивосток, 2001, 2003, 2004), на Международном симпозиуме по проблемам мейоза (Санкт-Петербург, 2003), на ежегодной конференции ИБМ ДВО РАН 2005 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы (292 источников, из которых 186 на иностранном языке), проиллюстрирована 1 графиком, 5 схемами, 4 таблицами, 16 микрофотографиями и 84 электронограммами. Общий объем работы 116 страниц.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своим научным руководителям: д.б.н., ведущему научному сотруднику А.А. Реунову, д.б.н., профессору В.Н. Иванкову за помощь и постоянную поддержку в работе, а также директору ИБМ ДВО РАН академику В.Л. Касьянову за предоставленную возможность выполнения исследований в Институте биологии моря. Большое спасибо, сотрудникам лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН, к.б.н. О.Г. Шевченко, Д.В. Фомину за консультации, моральную поддержку, помощь в обработке материала и проведении электронно-микроскопических исследований. Я также признательна сотрудникам лаборатории биологии прибрежных вод ТИНРО-центра за помощь в сборе материала.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Глава 1. КРАТКИЙ ОБЗОР БИОЛОГИИ И МОРФОЛОГИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА HIPPOGLOSSOIDES. СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ВИДОВ РОДА**

Кратко описана история отечественных и зарубежных исследований по распространению, биологии и морфологии представителей рода *Hippoglossoides*. Рассматриваются основные этапы и направления исследований, а также современное систематическое положение видов рода (Норманн, 1934; Шульц, Деляси, 1935; Таранец, 1937; Шабано, 1946; Шмидт, 1950; Моисеев, 1946, 1953; Норман, Вилимовский, 1954; Андрияшев, 1937, 1954; Окада, 1955; Перцева-Остроумова, 1961; Wilimovsky et al., 1967; Forrester et al., 1977; Коваль, Богданов, 1979, 1982; Фадеев, 1984, 1987; Линдберг, Федоров, 1993).

### **Глава 2. ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ГАМЕТОГЕНЕЗЕ КОСТИСТЫХ РЫБ**

На основе литературных сведений даны краткое описание половых циклов, характеристика шкал зрелости половых желез рыб.

#### **2.1. Использование особенностей формирования и строения гамет в таксономии костистых рыб**

Анализ морфологии и цитохимии оогенеза (особенно в период вителлогенеза) позволил выяснить, что наиболее четкая дифференциация рыб в строении яйцеклеток происходит между таксонами высоких рангов на уровне: отряд, подотряд, семейство. Менее значительные, но достаточно существенные различия отмечены в организации ооциов у рыб таких таксонов, как подсемейство, род, вид (Иванков, 1987; Дроздов, Иванков, 2000). Однако, типы развития половых клеток изучены не для всех групп костистых рыб. Надо отметить, что данные об ультраструктурных механизмах оогенеза к

решению таксономических задач привлечены впервые. Исследование дифференциации женских половых клеток с применением методов электронной микроскопии представляется перспективным направлением в современной кладистике рыб.

Несмотря на то, что сперматогенез и сперматозоиды изучены у большого количества представителей рыб, какие-либо рекомендации, сделанные на основе сравнительного анализа сперматогенных клеток, отсутствуют. Как показали наши предварительные данные (Незнанова и др., 2003; Реунов и др., 2004), такие аспекты сперматогенеза рыб, как строение вспомогательных клеток, особенности спермиогенеза и резорбции спермиев, могут иметь существенные различия и могут быть использованы как дополнительные таксономические признаки. Из-за отсутствия в литературе метода использования ультраструктурных особенностей дифференциации мужских гамет, дальнейшее развитие данного направления представляется перспективным.

## **2.2. Сперматогенез**

Общие представления о периодах созревания и развития мужских половых клеток, строения семенников, а также строения вспомогательных клеток.

## **2.3. Оогенез**

Общие представления о периодах созревания и развития женских половых клеток, а также строения вспомогательных клеток.

## **Глава 3. КРАТКАЯ ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНА ИССЛЕДОВАНИЯ**

Представители двух групп палтусовидных камбал - япономорская палтусовидная *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовая *H. (Cleisthenes) herzensteini*, обитают и нерестятся в заливе П. Великого. На основе литературных сведений дана характеристика основных течений и водных масс Японского моря, проведен анализ особенностей гидрохимических и климатических условий акватории.

## **Глава 4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В основу работы положен материал, собранный автором в весенне - летний период 2001-2003 гг. Большая часть материала собрана в Уссурийском, Амурском заливах (зал. Петра Великого, Японское море), а также в бухте Патрокл. Отлов рыб проводился тралами, ставными неводами, удочками. После отлова проводили биологический анализ рыб, для суждения о репродуктивном состоянии рыб использовали визуальное определение степени зрелости гонад самцов и самок камбал по шестибальной шкале, модифицированной для порционно нерестящихся рыб (Правдин, 1966).

#### **4.1. Гистологические исследования**

Для оценки общего состояния гонад самцов и самок палтусовидной и остроголовой камбал использовали полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим. Срезы изучали под микроскопом Polyvar. В работе для светооптических исследований также использовали препараты, любезно предоставленные В. Н. Иванковым

#### **4.2. Электронно-микроскопические исследования**

Для электронно-микроскопических исследований кусочки гонад самцов и самок палтусовидной *H. (H). dubius* и остроголовой *H. (C). herzensteini* камбал фиксировали в течение двух часов в 2.5% глютаральдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (рН 7.4), с постфиксацией в 2% четырехоксида осмия на том же буфере. После обезвоживания в спиртах материал заливали в смолу Аралдит. Срезы получали с применением ультрамикротомы Reichert-E, отконтрастированы водным уранил-ацетатом в течение 20 мин. и водным цитратом свинца в течение 2 мин. Полученные срезы исследованы и сфотографированы с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 100В.

#### **4.3. Морфометрическое исследование**

Фрагменты семенников и яичников от каждой особи исследуемых видов были залиты в отдельный блок. С каждого блока получали по три бленды и по пять серийных срезов с каждой. На каждом срезе изучали по десять сперматогенных и оогенных клеток, по десять ранних оогониев, ооцитов и по три поздних половых клетки. Для каждого объекта подсчитывали общее количество структур и их количественное распределение на один срез клетки. В ооцитах подсчитывали образование желточных гранул на 90 срезах клеток. Полученные данные обрабатывали с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

### **Глава 5. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА**

#### **5.1. Сперматогонии и сперматоциты**

##### ***Япономорская палтусовидная камбала***

Первичные сперматогонии, имеют большое округлое ядро, с диффузным, равномерно распределенным по ядру хроматином и отчетливо очерченным ядрышком. Их диаметр 8 - 10.5 мкм. В цитоплазме присутствуют электронно-плотные структуры, состоящие из рыхлого материала, не окруженные мембраной, которые мы характеризуем как вещество зародышевой плазмы, или половые детерминанты. Митохондрии (диаметр 0.3 мкм) имеют овальную форму, прозрачный матрикс с большим количеством крист. Аппарат Гольджи представлен отдельными диктиосомами состоящем из 6 цистерн. Сперматоциты практически одного размера со сперматогониями, их диаметр 10.5 мкм. На

стадии пахинемы можно наблюдать образование синаптонемальных комплексов – маркеров первичных сперматоцитов. В цитоплазме располагаются различной величины, неправильной формы митохондрии, диаметром 0.5 – 0.7 мкм. Рядом с комплексом Гольджи находятся центриоли.

#### ***Остроголовая камбала***

Сперматогонии имеют большое округлое ядро, с диффузным, равномерно распределенным по ядру хроматином и отчетливо очерченным ядрышком. Средний диаметр гониев 6 мкм. Присутствуют электронно-плотные структуры, состоящие из рыхлого материала, не окруженные мембраной, которые мы характеризуем как вещество зародышевой плазмы, или половые детерминанты. Митохондрии имеют округлую форму и прозрачный матрикс с незначительным количеством крист 0.4 – 0.5 мкм. Первичные сперматоциты меньше сперматогониев. Диаметр их 4.5 мкм. На стадии пахинемы можно наблюдать образование синаптонемальных комплексов – маркеров первичных сперматоцитов. В цитоплазме располагаются мелкие и крупные различной, чаще овальной формы митохондрии (диаметром 0.4 – 0.5 мкм).

### **5.2. Сперматиды**

#### ***Япономорская палтусовидная камбала***

Ранние сперматиды имеют диаметр от 2 до 5.5 мкм. Форма ядра округлая, с конденсированным хроматином. Митохондрии располагаются по всему объему цитоплазмы, вокруг ядра, их диаметр 0.4 – 0.6 мкм. Центриолярный аппарат находится в базальной ямке. От ядра отпочковывается большое число вакуолей, некоторые из них содержат плотные компоненты. По мере конденсации хроматина и уменьшения объема ядра митохондрии начинают группироваться в средней части спермия.

#### ***Остроголовая камбала***

Ранние сперматиды овальные, с равномерно конденсированным хроматином, размеры 3 - 3.5 мкм. Цитоплазма содержит мелкие, расположенные по всему объему митохондрии (диаметр 0.4 – 0.5 мкм), цистерны эндоплазматического ретикулула, излишки ядерной оболочки в виде пузырьков. Центриолярный аппарат расположен в базальной ямке и связан с системой, цитоплазматических микротрубочек, охватывающей ядро с двух сторон. По мере конденсации хроматина и уменьшения объема ядра митохондрии начинают группироваться в средней части сперматиды. В цитоплазме сперматиды находится комплекс Гольджи, в котором формируется проакросомная везикула, сохраняющаяся на более поздней стадии конденсации хроматина и исчезающая при образовании спермия.

### **5.3. Строение спермиев**



### ***Япономорская палтусовидная камбала***

Спермии имеют пулеобразную форму головки и длинный жгутик (рис. 1А). Общая длина головки 2.2 мкм. В головке содержится ядро, заполненное электронно-плотным хроматином. Длина ядра 1.9 - 2 мкм. Ширина ядра 1.2 – 1.3 мкм. Средняя часть спермия - 0.3 мкм. В базальной части ядра имеется инвагинация включающая в себя проксимальную и дистальную центриоли – центриолярная ямка, протяженностью 0.5 мкм. Центриоли располагаются в ней под углом друг к другу (рис. 1Б). Центриолярный аппарат расположен симметрично в ядерном углублении (рис. 1Б, В) и окружен кольцом из восьми сферических митохондрий, с пластинчатыми кристами беспорядочно расположенными в электронно-прозрачном матриксе, диаметр митохондрий 0.2 – 0.3 мкм (рис. 1Г). Дистальная центриоль является базальным тельцем жгутика спермия, имеющего типичную структуру из девяти периферических и двух центральных пар микротрубочек, одетых цитоплазматическим чехлом. Диаметр жгутика 0.2 мкм. Средняя часть отделена от жгутика слоем цитоплазмы.

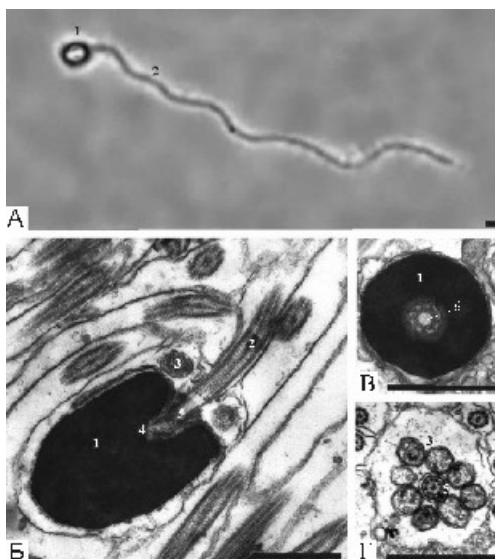


Рис.1. Сперматозоид япономорской палтусовидной камбалы.

1 – ядро; 2 – жгутик; 3 – митохондрии; 4 – проксимальная центриоль; 5 – дистальная центриоль; 6 – аксонема. Масштаб 1 мкм.

### ***Остроголовая камбала***

Спермии имеют колоколообразную форму головки, с электронно-плотным ядром и длинный жгутик (рис. 2А, Б). Общая длина головки 1.8 мкм, ядра 1.5 – 1.6 мкм, ширина ядра 1.2 – 1.4 мкм, средняя часть спермия 0.4 мкм. В основании ядро образует глубокое впячивание – центриолярную ямку, простирающееся до его середины (рис. 2Б, В). Центриолярный аппарат погружен в центриолярную ямку. Проксимальная центриоль располагается на одной оси с базальным тельцем и также ориентированна (рис. 2Б). Митохондриальное кольцо состоит из шести митохондрий с пластинчатыми кристами,

диаметром 0.3 – 0.4 мкм (рис.2Г). Аксонема имеет типичное строение, описываемое формулой 9+2 и окружена мембраной (рис.2Г).

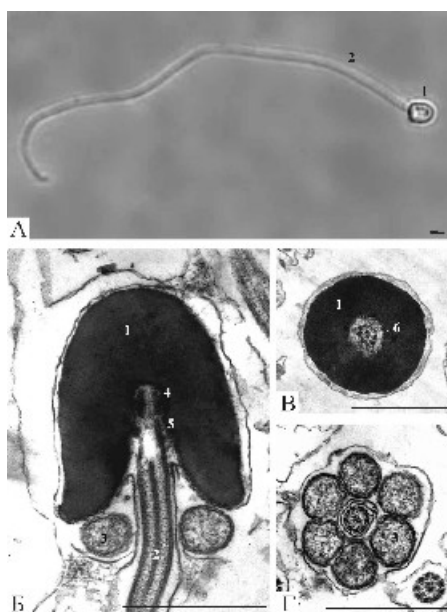


Рис. 2. Сперматозоид остроголовой камбалы

1 – ядро; 2 – жгутик; 3 – митохондрии; 4 – проксимальная центриоль; 5 – дистальная центриоль; 6 – аксонема. Масштаб 1 мкм.

#### 5.4. Вспомогательные клетки

##### *Япономорская палтусовидная камбала*

Фоликулярная клетка поляризована, большинство органелл находится в базальной части, тогда как в апикальной части их практически нет. Базальная цитоплазма клетки содержит крупное ядро неправильной формы, хотя нередко встречаются ядра округлой формы. В базальной части располагаются диктиосомы аппарата Гольджи, состоящие из стопки плоских цистерн с расширенными концами и многочисленных мелких вакуолей. Как правило, боковые и базальные поверхности клеточной мембраны образуют неглубокие складки. Цитоплазма клеток электронно-прозрачная. Апикальная цитоплазма содержит многочисленные пузырьки гладкого эндоплазматического ретикулула, заполненных гомогенным материалом средней электронной плотности. В цитоплазме располагаются небольшие лизосомоподобные тельца (0.2 – 0.4 мкм). Митохондрии представлены самой разнообразной формой, от округлой до лопастевидной, чаще овальной (размеры 0.3 – 0.5 мкм). В цитоплазме находятся многочисленные вакуоли, наполненные хлопьевидным материалом различной электронной плотности. Иногда в цитоплазме можно наблюдать везикулярные тельца небольших размеров в виде плотных, спирально скрученных мембран со светлым в центральной части матриксом. Вся цитоплазма клетки пронизана многочисленными микротрубочками и микрофиламентами. Располагаются эти структуры равномерно по всей цитоплазме.

### ***Остроголовая камбала***

Вспомогательные клетки, формирующие стенки фолликулов, имеют вытянутую, уплощенную форму. Как правило, стенка фолликула организована слоем нескольких, как бы налегающих друг на друга клеток, содержащих ядра характерной овально-лопастной формы. Вся цитоплазма клетки пронизана многочисленными микротрубочками и микрофиламентами. Изредка встречаются небольшие лизосомоподобные тельца, в виде округлых мембранных пузырьков диаметром 0.3 – 0.5 мкм, с гомогенным электронноплотным матриксом. Митохондрии имеют округлую, изредка неправильно-овальную форму. В плотном, зернистом матриксе митохондрий хорошо различимы пластинчатые кристы, ориентированные произвольным образом 0.3 – 0.6 мкм. Шероховатый эндоплазматический ретикулум представлен многочисленными трубочками, параллельно расположенными в цитоплазме клетки. Гладкий эндоплазматический ретикулум состоит из многочисленных цистерн.

### **5.5. Резорбция спермиев**

#### ***Япономорская палтусовидная камбала***

В мужских гонадах отнерестившихся особей присутствует некоторое количество не выметанных сперматозоидов, которые подвергаются постепенной деструкции, сопровождаемой фагоцитарной активностью фолликулярных клеток. Преддеструктивный сперматозоид имеет строение, типичное для нормальных гамет; ядро сохраняет целостность и заполнено электронно-плотным хроматином; наблюдается нормальная локализация центриолей и митохондрий в средней части. Единственным признаком, который можно отнести к видимым ультраструктурным повреждениям, является разрыв клеточной мембраны, которому предшествует ее набухание, которое наблюдается как в области головки, так и в зоне жгутика. Разрывы клеточных мембран сопровождаются отделением мембранных участков от сперматозоидов, в результате чего можно наблюдать мужские гаметы, только частично окруженные мембраной. Потеря мембранных участков сперматозоидами приводит к появлению в полости гонады закрученных мембранных конгломератов, формирующихся путем объединения "блуждающих" мембранных фрагментов. Данные конгломераты обычно расположены вблизи спермиев. Довольно часто можно наблюдать явление захвата сперматозоидов мембранными конгломератами и это приводит к тому, что мужские гаметы оказываются заключенными внутри них. Сперматозоиды, "обмотанные" мембранами, фагоцитируются фолликулярными клетками, в результате чего их часто можно наблюдать в цитоплазме данных клеток. Резорбция фагоцитированных гамет сопровождается появлением остаточных телец, скопления которых в избытке присутствуют в фолликулярных клетках.

### ***Остроголовая камбала***

У этого вида остаточные сперматозоиды, присутствующие в гонадах отнерестившихся особей, подвергаются деструкции, происходящей путем самораспада гамет. На начальном этапе наблюдается набухание клеточной мембраны, одновременно с которым в ядре появляются электронно-светлые участки. Впоследствии происходит разрыв клеточной мембраны с отделением ее фрагментов от сперматозоида. Наблюдается прогрессирующая фрагментация хроматина, в результате чего ядро сначала распадается на глобулоподобные продолговатые фрагменты. Хроматин ядер в последующей стадии распада имеет вид мелкодиспергированного материала. В средней части сперматозоидов, которые не имеют клеточных мембран, отмечается рассредоточение митохондрий. Поперечные и продольные срезы позволяют идентифицировать явление продольного расслоения жгутиков. При исследовании распавшихся жгутиков на поперечных срезах можно наблюдать, что характерным признаком нарушения аксонемальной структуры является разделение половин, состоящих из четырех и пяти дублетов микротрубочек. В полости гонады отмечается тенденция к группированию мембранных фрагментов, отделившихся от сперматозоидов. Как правило, происходит закручивание таких мембранных скоплений, сопровождаемое вовлечением в центр мембранного конгломерата частиц распавшихся сперматозоидов, уплотненная субстанция которых приобретает вид остаточного тельца. Сформированные остаточные тельца представлены в виде электронно-плотных тел, имеющих concentricкую структуру. Наши наблюдения показывают, что фолликулярные клетки, выстилающие гонаду тонким одноклеточным слоем, не принимают участия в фагоцитировании образующихся остаточных телец.

## **Глава 6. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ООГЕНЕЗА**

### **6.1. Превителлогенез**

#### ***Япономорская палтусовидная камбала***

В ооцитах начала превителлогенеза отмечается зональность в расположении органоидов цитоплазмы. Перинуклеарная зона цитоплазмы практически не содержит включений, кроме пиаге-материала с примыкающими к нему митохондриями (0.3 – 0.5 мкм). Митохондрии часто приобретают неправильную форму за счет вздутия одной или нескольких крист; иногда внутренняя или внешняя мембрана разрушается. Митохондрия тогда теряет целостность, или превращается в подобие мультивезикулярного тельца. Эндоплазматическая сеть представлена в основном элементами гладкого ретикулула. Аппарат Гольджи представлен отдельными диктиосомами, каждая из которых состоит из 3-5 цистерн. На самом краю ооцита находятся вакуоли диаметром 0.5 – 1 мкм,

содержащие коагулят, ограниченные клеточной мембраной и образованные эндоплазматическим ретикулумом. На поверхности ооцитов диаметром от 150 мкм, образуются микроворсинки длиной 0.75 мкм и толщиной 0.5 мкм

#### ***Остроголовая камбала***

В ооцитах в период фазы превителлогенеза митохондрии занимают преимущественно околядерное положение, они часто имеют вытянутую овальную форму и достигают диаметра 0.5 – 1.5 мкм. К ядерной оболочке примыкают скопления пиаге-материала. В цитоплазме ооцита наблюдаются, наряду со свободными рибосомами, цепочки полисом. Цитоплазма яйцеклетки заполнена множеством пузырьков гладкого эндоплазматического ретикулума. В аппарате Гольджи количество цистерн в составе диктиосомы – 6 – 7. В ходе дальнейшего развития число митохондрий увеличивается, они равномерно распределяются по всей цитоплазме. На периферии ооцита располагаются небольшие вакуоли, всегда заполненные коагулятом и ограниченные мембраной, а также гранулы шероховатого эндоплазматического ретикулума. Встречаются мультислойные тельца, образующиеся из разрушающихся митохондрий. На поверхности ооцитов диаметром от 80 мкм, образуются микроворсинки длиной 0.5 мкм и толщиной 0.3 мкм.

### **6.2. Вителлогенез**

#### ***Япономорская палтусовидная камбала***

Электронно-микроскопическое исследование показывает, что матрикс цитоплазмы начала вителлогенеза заполнен большим количеством митохондрий различных размеров, присутствует большое количество свободных рибосом. Первые небольшие электронно-плотные включения желточного материала появляются в матриксе митохондрий, впоследствии полностью заполняющем пространство митохондрий. Размер митохондрий 1.5 мкм. Митохондрии лежащие под оболочкой мелкие, округлой или овальной формы с непрозрачным матриксом. Вакуоли на этой стадии двух типов - небольшие, около 3 – 3.5 мкм, заполненные довольно плотным зернистым содержимым, и крупные вакуоли с электронно-прозрачным матриксом в окружении мелких митохондрий. В матриксе цитоплазмы присутствуют мультивезикулярные тельца, вероятно образованные из митохондрий и содержащие зернистый матрикс.

#### ***Остроголовая камбала***

В начале вителлогенеза в цитоплазме ооцитов наблюдается большое количество митохондрий различной форм и размеров (диаметр 0.2 – 1 мкм). Под оболочкой ооцита располагаются митохондрии палочковидной формы, их размер 1 – 2 мкм, ближе к ядру ооцита присутствуют небольшие округлые митохондрии размером 0.2 мкм. Вакуоли образованы цистернами эндоплазматического ретикулума, содержат электронно-

прозрачный коагулят, их размер 1.5 – 2 мкм. Накопление желточного материала происходит в вакуолях путем слияния более мелких гранул коагулята с крупными. Многие вакуоли не имеют мембранной оболочки. В цитоплазме также присутствует аппарат Гольджи имеющий форму дуги. В цитоплазме ооцита образуется с участием цистерн эндоплазматического ретикулума мультипластинчатое тело. В дальнейшем происходит слияние крупных желточных гранул с более мелкими гранулами.

### 6.3. Строение оболочек ооцитов

#### *Япономорская палтусовидная камбала*

Толщина оболочки ооцита 6 – 6.5 мкм. По мере созревания ооцита лучистая оболочка становится двухслойной, а потом трехслойной. Внутренний и внешний слой примерно одинаковы по ширине. Внутренний слой состоит из ряда пластин или ламелл, средний и внешний слои не структурированы, радиальные каналцы пронизывают её насквозь.

#### *Остроголовая камбала*

По мере развития ооцита количество микрослоев составляющих оболочку увеличивается, она утолщается. Так как микрослои по своей структуре одинаковы, то можно полагать, что оболочка ооцита монослойная, толщина оболочки 5.5 – 6 мкм.

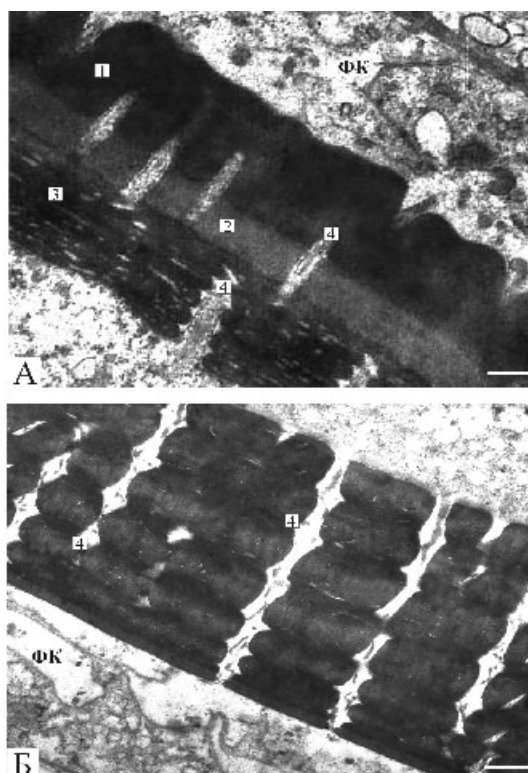


Рис. 3. Оболочки япономорской палтусовидной (А), остроголовой камбал (Б).

1 – наружный, 2 – средний, 3 – внутренний слои оболочки; 4 – каналцы; ФК – фолликулярная клетка. Масштаб 1 мкм.

## Глава 7. ОБСУЖДЕНИЕ

### 7.1. Сравнительный анализ фолликулярных клеток в семенниках

Исследование сперматогенного эпителия семенников палтусовидной и остроголовой камбал показало существование различных морфотипов вспомогательных клеток у этих видов. Вспомогательные клетки, обнаруженные у *H. (Hippoglossoides) dubius*, по структурной организации соответствуют таковым, описанным у других видов костистых рыб, (Nicholls, Graham, 1972; Gresik et al., 1973; Audy, 1978; Loir, 1990b). Тип фолликулярных клеток остроголовой камбалы (см. разд. 5.4) ранее не был описан ни у одного из представителей костистых рыб, и по-видимому, должен быть привнесен, как новая разновидность клеток данного типа. Существование различных типов вспомогательных клеток у представителей филогенетически близких таксонов присуще, по-видимому, не только костистым рыбам, но и другим многоклеточным животным. Так, например, два типа вспомогательных клеток было недавно обнаружено у голотурий, что позволило авторам (Reunov et al., 2001) сделать предположение о применимости исследований фолликулярных клеток в качестве структур, сравнительное изучение которых важно при выяснении филогении Holothuroidea наряду с особенностями строения гамет.

### 7.2. Сравнение особенностей сперматогенеза камбал

Анализ морфологии развивающихся мужских половых клеток палтусовидной *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовой камбал *H. (Cleisthenes) herzensteini* позволил выяснить, что на стадии сперматогоний в строении как элементов зародышевой плазмы, так и в особенностях организации ядра и других органоидов различий не обнаружено. Сперматоциты япономорской палтусовидной и остроголовой камбал также подобны. Для сперматид характерны ярко выраженные видовые особенности дифференциации. Так, у остроголовой камбалы центриольный аппарат ранней сперматиды связан с системой микротрубочек, по-видимому принимающих участие в морфогенезе клетки. У палтусовидной камбалы микротрубочки в сперматидах не найдены. Отсутствие микротрубочек у палтусовидной камбалы не является артефактом, так как оба типа спермиогенеза (микротрубочковый и безмикротрубочковый) известны у многоклеточных животных (Hodgson, 1992; Реунов, Чернышев, 1992; Reunov, Rice, 1993; Reunov, Klepal, 1997 и др.). Как было отмечено в обзоре литературы, в раннем спермиогенезе некоторых видов костистых рыб наблюдаются начальные стадии формирования акросомной вакуоли, которая постепенно регрессирует (Mattei, Mattei, 1978; Billard, 1983). Интересно то, что формирование подобной вакуоли происходит и в сперматидах остроголовой камбалы, тогда как у палтусовидной камбалы структуры, сравнимые с остаточной акросомой не

найлены. Показано, что акросомоподобная структура возникает путем расширения одной из диктиосом комплекса Гольджи. Однако, в процессе спермиогенеза происходит ее элиминация из цитоплазмы, в результате чего спермий является безакросомным. Сперматозоиды япономорской палтусовидной и остроголовой камбал имеют практически одинаковые размеры, различаются формой головки спермия, положением центриолей по отношению друг к другу и количеством митохондрий в митохондриальном кольце.

### **7.3. Сравнительный анализ резорбции сперматозоидов в семенниках**

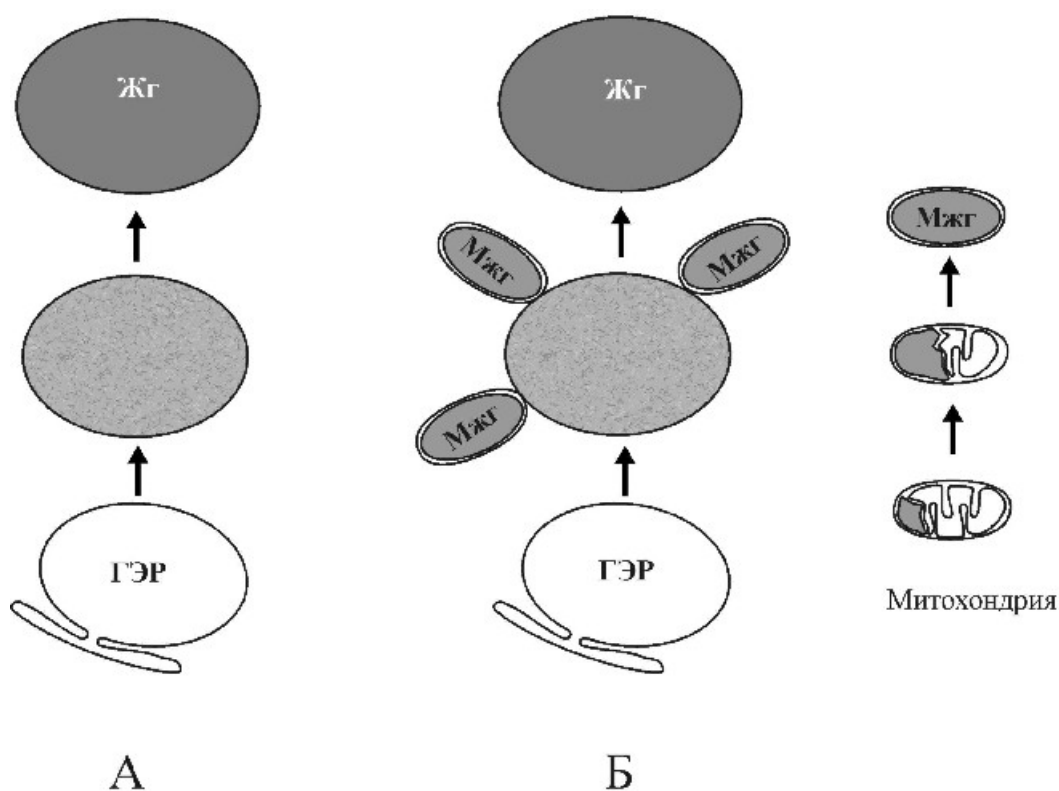
У палтусовидной камбалы функцию посленерестовой очистки гонады выполняют фолликулярные клетки, фагоцитирующие и резорбирующие сперматозоиды, что характерно для костистых рыб (Billard et al., 1972; Nicholls, Graham, 1972; Gresik et al., 1973; Guraya, 1976; Nagahama et al., 1978; Kerr et al., 1980; Grier et al., 1980; Grier, 1981; Nagahama et al., 1982; Soley, Vuren, 1984; Kretser, 1988; Grier et al., 1989; Dudois, Callard, 1989; Максимович, 2002) и других представителей многоклеточных животных (Рузен-Ранге, 1980; Buckland-Nicks, Chia, 1986; Sakai, Yamashina, 1989; Cavey, Markel, 1994; Jorgensen, Lutsen, 1997). Дополнением к традиционному способу фагоцитирования гамет, обнаруженным у палтусовидной камбалы, является предварительная мембранная “упаковка” спермиев, подлежащих фагоцитозу. Эта особенность ранее не была обнаружена у костистых рыб, впервые обнаружена и является видоспецифичной для *H. (Hippoglossoides) dubius*. У остроголовой камбалы деструкция гамет происходит способом, не описанным ранее для костистых рыб. Данный процесс происходит без участия фолликулярных клеток и может быть охарактеризован как самораспад, сопровождаемый фрагментацией хроматина, аксонемальных структур и выходом митохондрий в полость гонады. Вероятно, наблюдается автолитический паттерн клеточной деградации (Хотимченко и др., 1993), сопровождаемый активизацией гидролаз, обеспечивающих структурную фрагментацию хроматина и клетки в целом. Считается (Clarke 1990; Majno, Joris, 1995; Huppertz et al., 1999), что фрагментация ядерного материала является первичным проявлением программной клеточной смерти – апоптоза, реализацию которой обеспечивают ферменты "каспазы". Существуют и другие способы клеточной деструкции, обеспечиваемые группами пока неизученных генов (Clarke, 1990; Vaux, Korsmeyer, 1999), поэтому распад гамет теоретически может происходить неапоптотическим способом.

### **7.4. Сравнение особенностей оогенеза и яйцевых оболочек камбал**

В превителлогенных ооцитах япономорской палтусовидной и остроголовой камбал происходят характерные изменения органелл, сходные как у других видов костистых рыб, так и у *H. (Hippoglossoides) dubius*. и *H. (Cleisthenes) herzensteini* (Yamamoto, Onozato, 1965; Ulrich, 1969; Озернюк, Пальмбах, 1974; Емельянова, 1979; Brusle, 1980; Selman et al.,



1993; Чмилевский, Каменева, 2001). Отличительной особенностью морфологии ооцитов исследованных видов является отсутствие желточного ядра (Равен, 1964). В ооцитах периода вителлогенеза обнаружены различия в способах формирования желтка (рис. 4). В ооцитах палтусовидной и остроголовой камбал, как у многих видов костистых рыб, различают два вида желточных зерен – эндогенного и экзогенного происхождения. В ооцитах остроголовой камбалы желточный материал накапливается в вакуолях, образованных эндоплазматическим ретикуломом. Желточный материал представляет собой неоднородные глобулы состоящие из мелких зернистых включений (рис. 4А). В ооцитах палтусовидной камбалы желточные зерна эндогенного происхождения образуются при участии митохондрий (рис. 4Б). Подобное образование желточных зерен отмечено для золотой рыбки, а также отмечено для осетровых (Yamamoto, Onozato, 1965; Райкова, 1973). В ооцитах мозамбикской тилапии накопление желтка происходит также при участии митохондрий, преобразующихся в кольцевидные структуры (Чмилевский, Каменева, 2003). У данио *Brachydanio rerio* эндогенный желток формируется при участии шероховатого эндоплазматического ретикулума (Ulrich, 1969). У изученных видов камбал желточные гранулы образуются в цистернах эндоплазматического ретикулума, имеют зернистое строение и окружены мембраной.



гэр - гладкий эндоплазматический ретикулум;  
жг - желточная гранула; мжг - желточные гранулы  
митохондриального происхождения

Рис. 4. Схематическое изображение образования желтка в ооцитах остроголовой (А) и япономорской палтусовидной (Б)

С переходом к фазе интенсивного желткообразования поступление вителлогенина увеличивается, об этом свидетельствует большое количество окаймленных пиноцитозных пузырьков и мелких желточных зерен. Окаймленные пиноцитозные пузырьки и избирательное включение вителлогенина отмечены авторами, изучавшими оогенез костистых рыб (Ulrich, 1969; Wallace, Selman, 1981; Selman, Wallace, 1983; Tyler et al., 1987). Образование экзогенного желтка в ооцитах палтусовидной камбалы можно объяснить используя схему Опрешко с соавторами (Opreshko et al., 1980) для ксенопуса, а так же результаты Йошизаки (Yoshizaki, 1992).

Ооциты япономорской палтусовидной отличаются от ооцитов остроголовой камбалы размерами, изменчивостью и размерами вакуолей, желточных гранул и глобул, строением оболочек, а также формированием желточных зерен.

Данные различия дополняют перечень ранее полученных критериев, на основании которых становится очевидной необходимость пересмотра принадлежности *H. (C.) herzensteini* к роду *Hippoglossoides* и выведении рода *Cleisthenes* в самостоятельный таксон. Полученные результаты показывают целесообразность и перспективность ультраструктурных исследований гамет для выяснения родственных отношений и таксономического положения различных групп и отдельных видов рыб.

## ВЫВОДЫ

1. Метод ультраструктурного анализа дифференциации гамет показал, что для исследованных видов камбал характерно определенное строение и функционирование половых клеток, структурные характеристики которых можно использовать в таксономии для характеристики таксонов. Дальнейшее развитие данного метода представляется перспективным.
2. Отмечены существенные различия в ультраструктурных особенностях спермиогенеза. У остроголовой камбалы в фазах морфогенеза сперматид участвуют микротрубочки и происходит формирование акросомоподобной везикулы, чего не наблюдается в сперматидах япономорской палтусовидной камбалы. Изученные виды отличаются формой головки спермия и строением центриольного аппарата.
3. Фолликулярные клетки, участвующие в гаметогенезе исследованных камбал, отличаются формой и размерами. Для япономорской палтусовидной камбалы характерны фолликулярные клетки округлой формы и крупного размера, у остроголовой камбалы они небольшие и уплощенной формы.
4. В процессе резорбции спермиев обоих видов впервые обнаружено внеклеточное функционирование мембранных фрагментов, «обматывающих» структуры, подлежащие резорбции. Однако, у япономорской палтусовидной камбалы в мембранные конгломераты заключаются сперматозоиды, тогда как у остроголовой камбалы упаковке подвергаются фрагменты автолизированных гамет. Резорбция упакованных сперматозоидов у палтусовидной камбалы происходит в фолликулярных клетках, а у остроголовой камбалы фолликулярные клетки не участвуют в утилизации остаточных тел.
5. В процессе оогенеза отмечены различия в способах образования желточных гранул в период вителлогенеза. У япономорской палтусовидной камбалы в формировании желточных гранул принимают участие митохондрии, чего не отмечено у остроголовой камбалы. Ооциты палтусовидной и остроголовой камбал различаются размерами, степенью изменчивости и размерами вакуолей, желточных зерен и глобул.

6. Обнаружено различие в строении оболочек яйцеклеток. В период позднего вителлогенеза оболочка ооцита япономорской палтусовидной камбалы становится трехслойной, у остроголовой остается однослойной.

7. Существенные различия, отмеченные при исследовании оогенеза и сперматогенеза дополняют перечень критериев, на основании которых близкое родство япономорской палтусовидной и остроголовой камбал подвергается сомнению и показывает необходимость пересмотра принадлежности остроголовой камбалы к роду *Hippoglossoides* и выведения рода *Cleisthenes* (остроголовые камбалы) в самостоятельный таксон.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н., Реунов А.А. Сравнительное исследование вспомогательных клеток в семенниках *Glyptocephalus stelleri* Cottsche и *Pleuronectes pinnifasciatus* Kner (Teleostei, Pleuronectidae) // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 1. С. 1-3.

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н., Реунов А.А. Ультраструктурное исследование постнерестовой деструкции мужских гамет у остроголовой камбалы *Hippoglossoides herzensteini* (Teleostei, Pleuronectidae) и кеты *Oncorhynchus keta* (Teleostei, Salmonidae), как представителей морских и анадромных костистых рыб // Биология моря. 2005. Т. 31. № 2. С. 115-118.

Реунов А.А., Незнанова С.Ю., Иванков В.Н. Сравнительное исследование постнерестовой деструкции сперматозоидов у камбаловых рыб *Hippoglossoides (Cleisthenes) herzensteini* и *Hippoglossoides dubius* (Teleostei, Pleuronectidae) // Цитология. 2004. Т. 46. № 8. С. 704-709.

Реунов А.А., Незнанова С.Ю., Александрова Я.Н., Исаева В.В. Ультраструктурное исследование взаимодействия герминативных гранул и митохондрий у *Apostichopus japonicus* (Echinodermata, Holothuroidea) и *Pleuronectes asper* (Teleostei, Pleuronectidae) // Биология моря. 2004. Т. 30. № 3. С. 244-246.

Винников К.А., Иванков В.Н., Незнанова С.Ю., Реунов А.А., Борисовец Е.Э., Питрук Д.Л. Таксономический статус и родовая принадлежность япономорских камбал (п/сем. *Pleuronectinae*) // VI региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2004. С. 27-29.

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н. О родовой принадлежности и строении яйцеклеток некоторых видов камбал Японского моря // IV Региональная конференции по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2001. С. 87.

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н., Реунов А.А. Ультраструктурный механизм постнерестовой резорбции у кеты и остроголовой камбалы // Цитология. 2003. Т. 45. С. 904.

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н., Реунов А.А. Морфология гамет и систематическое положение палтусовидной *Hippoglossoides dubius* и остроголовой *Cleisthenes herzensteini* камбал (п.сем. *Pleuronectinae*) // V региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2003. С. 64-65.

Реунов А.А., Незнанова С.Ю., Исаева В.В. Электронно-микроскопическое исследование взаимодействия герминальных гранул и митохондрий в гониальных клетках камбалы // Цитология. 2003. Т. 45. С. 919-920.

Реунов А.А., Незнанова С.Ю., Иванков В.Н. Ультраструктурные механизмы постнерестовой деструкции сперматозоидов остроголовой *Cleisthenes herzensteini* и палтусовидной *Hippoglossoides dubius* камбал // V региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2003. С. 79-80.

Реунов А.А. (ИБМ), Незнанова С.Ю., Иванков В.Н. (ДВГУ) "Ультраструктурное исследование спермиогенеза у камбаловых рыб *Hippoglossoides (Cleisthenes) herzensteini* и *H. dubius (Teleostei, Pleuronectidae)*" // VI региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2004. С. 98.

НЕЗНАНОВА Светлана Юрьевна

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГАМЕТОГЕНЕЗА КАМБАЛ  
*HIPPOGLOSSOIDES DUBIUS* И *HIPPOGLOSSOIDES (CLEISTHENES) HERZENSTEINI* В  
СВЯЗИ С ПРОБЛЕМОЙ ИХ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ

Автореферат

---

Подписано в печать 03.05.2006. Формат 60x90/16. Бумага тип.

Печать ризограф. Заказ . Тираж 100 экз.

---

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр

Владивосток, тупик Шевченко, 4