

На правах рукописи

Вараксина Галина Степановна

**ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК
ГОНАДЫ МОРСКИХ ЕЖЕЙ *STRONGYLOCENTROTUS*
KUDUS и *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS***

03.00.12 - ЦИТОЛОГИЯ

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК**

Ленинград - 1978

Работа выполнена в Институте биологии моря ДВНЦ АН СССР

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РСФСР Мотевкин П.А.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
член-корр. АМН СССР Кнорре А.Г.,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Райкова Е.В.

Ведущая организация: Институт биологии развития имени
Н.К.Кольцова.

Защита состоится "3" ноября 1978 г. в 14
часов на заседании специализированного совета К.002.73.01
при Институте цитологии АН СССР по адресу 190121 Ленинград,
проспект Маклина, 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института цитологии АН СССР, где защищается диссертация.

Автореферат разослан "19" сентября 1978 г.

Ученый секретарь

специализированного совета

доктор биологических наук

Можзева Г.П.

Актуальность проблемы. Процессы формирования яйцеклеток у морских ежей рассматриваются противоречиво. Одни исследователи считают, что яйцеклетка морского ежа формируется по солитарному типу (Равен, 1964), другие пишут об алиментарном типе ее развития (Harvey, 1931; Landahl, 1932). По мнению Гнездиловой (1971), только ранний рост ооцита идет солитарным путем, на более поздних этапах клетка растет с участием вспомогательных элементов. Эти противоречия обусловлены отсутствием достоверных данных о путях поступления трофических веществ в развивающиеся половые клетки, недостаточно изученными взаимоотношениями ооцитов со вспомогательными клетками и не вполне установленной ролью, которую играют последние в оогенезе.

Вспомогательные клетки в гонаде морского ежа описаны давно (Giard, 1877; Богоявленский, 1911; Tawashima and Takashima, 1965). По современным представлениям предполагается, что они выполняют не одну, а ряд функций, в совокупности обеспечивающих нормальное развитие ооцитов. С этой точки зрения исследование вспомогательных клеток представляет большой интерес, тем более что литература об этих элементах отрывочна и весьма далека от своей полноты.

Цель и задачи работы. Основной целью работы явилось изучение вспомогательных клеток гонады морского ежа гистологическими, гистохимическими, автордиографическими и электронно-микроскопическими методами на протяжении репродуктивного цикла. Решались следующие задачи:

1. Количественное соотношение между вспомогательными и половыми клетками на протяжении полового цикла.

2. Цитология и ультраструктура вспомогательных клеток. Обращалось особое внимание на образование, расхождение и состав трофического материала как возможного источника для формирования половых элементов.

3. Взаимоотношения вспомогательных клеток с половыми элементами.

4. Участие вспомогательных клеток в резорбции и трофике ооцитов.

Научная новизна. В работе впервые подробно изучены трофические цитоплазматические включения. На основании ультраструктуры, гистохимии и тинкториальных свойств выделено три типа трофических глобул. Особенности структуры и химизма каждого типа глобул прослежены в течение полового цикла. Впервые достоверно установлена корреляция между заполнением цитоплазмы вспомогательных клеток глобулами и процессами резорбции ооцитов. Выявлена сочетанная закономерность между изменениями общего числа глобул и ростом половых клеток. Для изучения взаимоотношений между вспомогательными и половыми клетками впервые использованы vitalные красители. Обнаружено первичное появление красителей во вспомогательной клетке и последующее перемещение их в ооциты.

Практическая ценность работы. Морские ежи *Strongylocentrotus nudus* и *Strongylocentrotus intermedius* в заливе Петра Великого являются наиболее распространенными и ценными в пищевом отношении иглокожими. Поэтому изучение процессов, связанных с биологией размножения, имеет хозяйственное значение в связи с рациональным использованием и искусственным воспроизводством этих животных. Кроме того, яйцеклетки

порских ежей широко используются в биологии и медицине для решения различных вопросов эмбриологии, цитологии, биохимии и биофизики.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на Советско-Японском симпозиуме по биологии морских моллюсков и иглокожих (Находка, 1974), на У и УИ конференциях Института биологии моря ДВНЦ АН СССР, на II Всесоюзной конференции молодых ученых по вопросам сравнительной морфологии и экологии животных (Москва, 1975), на III Всесоюзном коллоквиуме по изучению иглокожих (Ленинград, 1976) и на семинаре Отдела цитологии Института биологии моря (Владивосток, 1976).

По материалам диссертации опубликовано 6 работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 164 страницах машинописом (печатный текст - 88 стр.) и состоит из введения, 5 глав, обсуждения, выводов и списка литературы. Иллюстративный материал представлен 3 рисунками, 7 таблицами, 7 графиками и 74 микрофотографиями. Список литературы содержит 32 работы на русском и 152 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

I. Материал и методы исследования

Порских ежей *Strongylocentrotus nudus* и *S. intermedius* охватывали в Уссурийском заливе с глубины 7-10 м два-три раза в месяц в течение 1973-1974 гг. Вспомогательные клетки исследовали от половозрелых самок на протяжении репродуктивного цикла. Обработан материал от 481 животного. Примерно поровну от каждого вида.

Кусочки гонад размером 3-5 мм фиксировали смесью Буэна, Незашина, Чизаччо, спирт-уксусной кислотой (3:1), спиртно-пикриновой кислотой и 10% раствором нейтрального формалина. Материал заливали в парафин по общепринятой методике. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали железным гематоксилином по Гейденрайну и гематоксилином Эрлиха с докраской эозином.

Для определения ДНК использовали специфическую реакцию Фельгена. РНК выявляли галлоцианин-хромовыми красками, суммарные белки - прочным зеленым при pH 2,2 и основные - при pH 3,0, углеводы - реактивом Шиффа по Шабдашу и Мак-Манусу, кислые мукополисахариды - методом Хейла. Параллельно ставили соответствующий контроль.

На препаратах, окрашенных гематоксилином Эрлиха, ежемесячно у 5 животных на протяжении года измеряли диаметр глобул. Все глобулы разделили на три размерные группы. О качественном и количественном изменении глобул судили на основании тинкториальных свойств и морфометрических данных. С этой целью в каждой размерной группе подсчитывали отдельно базофильные, эозинофильные и гетерогенные глобулы от трех животных на мм^2 гонады.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки гонад фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида на 0,1 M фосфатном буфере при pH 7,8, содержащем 0,5% раствор нейтрального формалина, 17% сахарозы при температуре 4°C в течение 2 час. Постфиксацию проводили 1% раствором четырехокси осмия на фосфатном буфере, содержащем 27% сахарозы, в течение 2 час. После обезвоживания в спиртах возрастающей

концентрации кусочки заливали в эпох 812. Срезы контрастировали 2% раствором уранилацетата, просматривали и фотографировали под электронным микроскопом ЭММА.

Для отбора клеток с целью последующего изучения их под электронным микроскопом с эпителиальных блоков готовили срезы толщиной 1 мкм и окрашивали толуидиновым синим-пиронином, затем просматривали и фотографировали под световым микроскопом. С выбранных участков ткани готовили тонкие срезы и фотографировали под электронным микроскопом. В последующем сравнивали фотографии, полученные с помощью светового и электронного микроскопов, и нужные клетки отбирали для дальнейшего исследования.

Методом автордиографии определяли синтез нуклеиновых кислот, белков и синтетическую активность клеток гонады в разные сезоны года. Кусочки гонад инкубировали *in vitro* в морской воде, содержащей H^3 -тимидин, H^3 -уридин (10 мкюри/мл) и H^3 -лейцин и H^3 -метионин (0,5 мкюри/мл) в течение 15 мин., 1, 2, 4, 6 час. Материал фиксировали в спирт-уксусной кислоте (3:1) и смесью Буэна, разбавленной морской водой 1:1. Парафиновые срезы обрабатывали аммиачной водой и покрывали фотоэмульсией типа "М" (НИИХимфото). Препараты экспонировали в течение 36 суток в темноте при 4°C.

Для изучения возможной передачи трофических веществ из вспомогательных клеток в ооциты ставили серии опытов с витальными красителями. Кусочки гонад инкубировали в 1% растворах трипанового синего, нейтрального красного и синьки Эванса, приготовленных на морской воде, в течение 1, 2, 4, 8 и 16 часов. Для того чтобы проследить пути перемещения

и месте накопления красителей, часть кусочков гонад, инкубированных 4 час (время, за которое происходит накопление красителей во вспомогательных клетках), переносили в морскую воду на 2, 4, 6, 12 и 18 час. Во всех опытах материал после инкубации промывали в 4 порциях морской воды с последующей фиксации жидкостью Буэна и заливали в парафин.

О степени развития вспомогательных и половых клеток на протяжении года судили на основании цитологических наблюдений и морфометрических данных. С помощью рисовального аппарата на бумагу наносили эцинусы, измеряли их площадь и площадь, занятую вспомогательными клетками. Полученные проекции измеряли полярным планиметром ПП-2к и вырезали в условных планиметрических единицах (Жесин, 1967). Площадь, занятую половыми клетками, определяли как разность площади эцинуса и площади, занятой вспомогательными клетками.

Все цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики (Плохинский, 1970).

2. Результаты исследования

Вспомогательные клетки под световым микроскопом не имеют четких границ и образуют ткань сетчатого вида с многочисленными ячейками равнообразной формы и величины. Границы клеток устанавливаются только с помощью электронного микроскопа, под которым видно, что вспомогательные клетки обладают различной, зачастую отроscчатой формой. Их вытянутые или овальные ядра содержат плотные глыбки хроматина. В светлой кариоплазме находится одно центрально расположенное ядрышко.

Вспомогательные клетки, особенно в начале оогенеза, со-

держат большое количество митохондрий. Эти меняющиеся по форме и размерам оргanelлы находятся в различных участках клетки. Умеренно развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум обычно располагается в поверхностном слое цитоплазмы. Аппарат Гольджи состоит из группы уплощенных цистерн, небольших вакуолей и гранул. В период образования и разрушения глобул рядом с пластинчатым комплексом появляются накопительные тельца с электронноплотным материалом. Они исчезают после того, как цитоплазма полностью освободится от включений.

В течение репродуктивного цикла, равного году, в гонаде морских ежей содержится гаметы разной степени зрелости и вспомогательные клетки. Количественные соотношения между ними меняются (рис. 1). На стадии "половой инертности" ацинусы небольшие. Вспомогательные клетки составляют 77% площади ацинуса. Остальная часть занята единичными зрелыми яйцеклетками и оогониями. На стадии "начало развития" отмечается рост ацинусов, что происходит одновременно с ростом ооцитов. Вспомогательные клетки по-прежнему многочисленны. С наступлением стадии "активного гаметогенеза" ацинусы разрастаются. Площадь, занятая вспомогательными клетками, постепенно снижается и на стадии "нереста" составляет 5% от площади ацинуса.

Вспомогательные клетки содержат мелкие (6 мкм), средние (7-12 мкм) и крупные (13-20 мкм) глобулы. Их динамика в клетках на протяжении года представлена на рисунке 2. Количество глобул главным образом мелких сильно увеличивается во время резорбции половых клеток и резко уменьшается в период трофоплазматического роста ооцитов.

Учитывая гинкториальные свойства и ультраструктуру, мы выделили три типа глобул. К первому относятся глобулы, содержащие плотный материал, толерантный к основным красителям. Под электронным микроскопом большинство таких глобул гомогенны и лишь некоторые включают пузырьки с частицами гликогена. Глобулы второго типа воспринимают кислые красители. Ультраструктурно они состоят из глыбок высокой электронной плотности и большого количества пузырьков с частицами гликогена. При разрушении глобул на полюсах образуются светлые вакуоли, напоминающие вторичные лизосомы. Третий тип глобул одновременно окрещивается как кислыми, так и основными красителями. В их состав входят сложные гранулы из электронноплотных частиц и пластичных тел; имеются гладкие мембраны, среди которых распадаются спиралевидные фигуры.

Динамике всех типов глобул показана на рисунке 3. Эозинофильные глобулы преобладают над базофильными. Меньше всего гетерогенных глобул. Силой численность глобул возрастает, по мере роста ооцитов уменьшается и на стадии "переста" становится минимальной.

Изменение общего числа глобул коррелирует с ростом и развитием ооцитов (рис. 4). В послеперестовый период глобул немного и объем ооцитов небольшой. Стадия "начало развития" характеризуется накоплением глобул и ростом ооцитов. С наступлением стадии "активного гаметогенеза" объем ооцитов нарастает, число глобул снижается.

Цитохимическое изучение вспомогательных клеток на протяжении репродуктивного цикла позволило выявить динамику некоторых химических веществ в этих клетках в связи с ростом

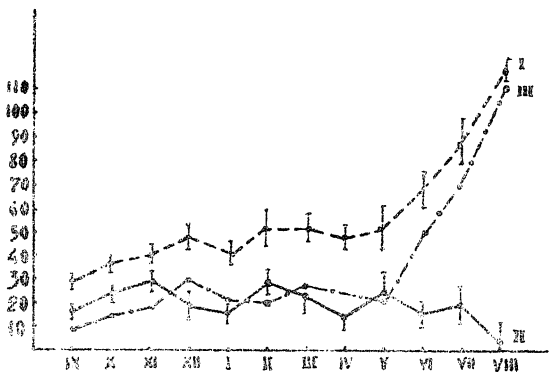


Рис. 1. Площадь акинуса (I) и доли его, занятые вспомогательными (II) и половыми (III) клетками.
 Обозначения: по оси ординат—площадь в условн. ед.; по оси абсцисс—месяцы.

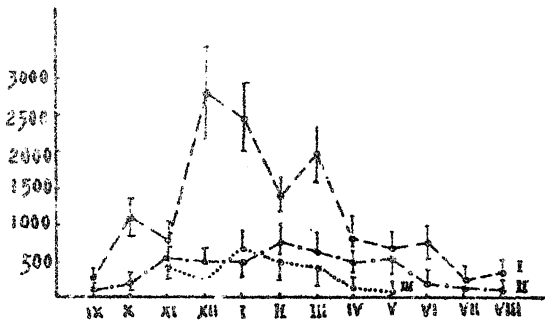


Рис. 2. Изменение числа мелких (I), средних (II) и крупных (III) глобул в течение года.
 Обозначения: по оси ординат—число глобул; по оси абсцисс—месяцы.

и развитием осцитов. Эти данные, полученные с помощью количественного метода, представлены в таблице. Результаты показали, что PAS - положительные включения выявляются в цитоплазме в виде гликогена и в глобулах II и III типов, где они представлены гликопротеидами. Высокая концентрация полисахаридов отмечается на стадиях "половой инертности" и "начало развития". К окончанию роста осцитов полисахаридных включений почти не остается.

Содержание кислых мукополисахаридов во вспомогательных клетках на протяжении года умеренное. Они представлены гиалуроновой кислотой и хондроитинсульфатом А и С. На всех стадиях репродуктивного цикла отмечается высокая концентрация суммарных белков в ядрышке и цитоплазме, в глобулах их больше всего на стадии "начало развития". Основные белки имеют высокую концентрацию.

Фосфолипидные включения на протяжении года выявляются в ядрышке и глобулах II типа. Высокое содержание фосфолипидов отмечается на стадии "начало развития". Триглицериды содержатся в цитоплазме и глобулах в сравнительно небольшом количестве.

РНК обнаружена в ядре, ядрышке, цитоплазме и глобулах I типа. Общее количество РНК нарастает на стадии "начало развития" и сохраняется в больших количествах до "преднерестовой" стадии.

Таким образом, вспомогательные клетки содержат белки, липиды, полисахариды и РНК. Вначале они богаты этими веществами. По мере роста осцитов количество трофических веществ во вспомогательных клетках уменьшается и к моменту

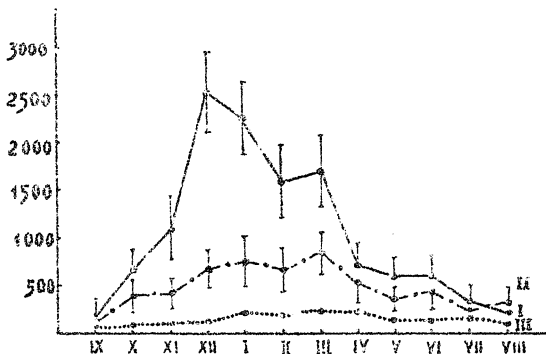


Рис. 3. Изменение числа эозинофильных (I), базофильных (II) и гетерогенных (III) глобул в течение года. Обозначения: по оси ординат—число глобул; по оси абсцисс—месяцы.

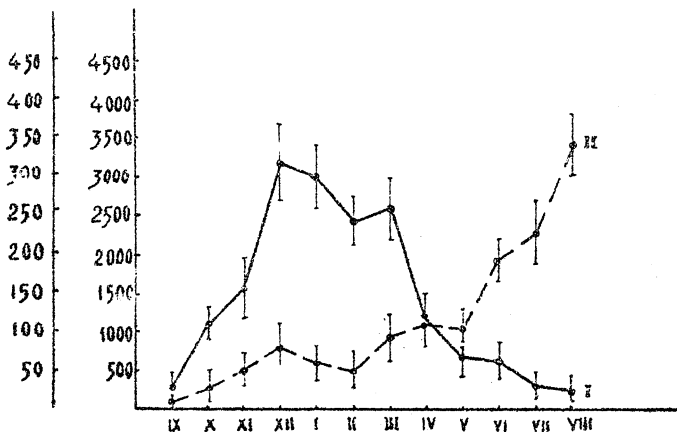


Рис. 4. Изменение общего количества глобул (I) и объема половых клеток (II). Обозначения: по оси ординат (справа налево) — число глобул и объем половых клеток в тыс мкм³; по оси абсцисс—месяцы.

Таблица

Содержание белков, липидов, полисахаридов и РНК во вспомогательных клетках на разных стадиях полового цикла

Название вещества	Стадия полового цикла	Ядрышко	Ядро	Типы глобул		
				Цитро	Плазма	III
Нейтральные полисахариды	Половая инертность	+++	++	++	+++	++
	Начало развития	+++	+++	+++	+++	++
	Активный гаметогенез	+++	+++	+++	+++	+
	Преднерестовая	+++	+++	+++	+++	+
Красные мукополисахариды	Половая инертность	+++	+	+	+	++
	Начало развития	+++	+	+	+	++
	Активный гаметогенез	+++	+	+	+	++
	Преднерестовая	+++	+	+	+	+
Суммарные белки	Половая инертность	+++	++	+++	+++	+
	Начало развития	+++	++	+++	+++	+
	Активный гаметогенез	+++	++	+++	+++	+
	Преднерестовая	+++	+	+++	+++	+

Основны									
белки									
половая инертность	+								
начало развития	+	++							
активный гаметогенез	+		+						
преднерестовая	+								
нерестовая	+								

половая инертность	+								
начало развития	+++								
активный гаметогенез	+++								
преднерестовая	++								
нерестовая	++								

Нейтральны									
жиры									
половая инертность									
начало развития									
активный гаметогенез									
преднерестовая									
нерестовая									

РН К									
половая инертность	+								
начало развития	+								
активный гаметогенез	+								
преднерестовая	+								
нерестовая	+								

Обозначения: + — мало;
 ++ — умеренно;
 +++ — много;
 ++++ — очень много;
 — — нет.

нереста почти не остается. Напротив, в ооцитах происходит накопление трофических включений и зрелая яйцеклетка содержит их в наибольшем количестве (Гнездилова, 1971).

Авторадиографические исследования с H^3 -тимидином показали, что наиболее активно предшественник включается во вспомогательные клетки сразу после нереста. Число клеток, синтезирующих ДНК, снижается по мере развития ооцитов ($p < 0,001$) и к началу нереста обнаружить меченые клетки становится невозможным.

Включение H^3 -уридина во вспомогательные и половые клетки отмечается как осенью, так и весной. В осенний период предшественник обнаруживается через 2 часа инкубации. Процент меченых ядер вспомогательных клеток с удлинением сроков инкубации увеличивается ($p < 0,001$), а концентрация метки варьирует незначительно. В ооцитах интенсивность включения возрастает одновременно с увеличением числа меченых ядер и ядрышек.

Весной включение H^3 -уридина в клетках гонады наблюдается уже через 15 мин инкубации. Процент меченых клеток и концентрация метки нарастает с удлинением сроков инкубации и к 6 часам достигает наибольшей величины.

Опыты с трипановым синим, нейтральным красным и синькой Эванса показали, что при часовой инкубации гонад в растворах красители обнаруживаются только во вспомогательных клетках. Появление красителей в ооцитах отмечается лишь после 8 часов инкубации. В гонадах, инкубированных в течение 4 часов и находящихся впоследствии в морской воде 2, 4, 6, 12 и 18 часов, витальные красители обнаружены в половых

клетках; причем через 18 часов цитоплазма большинства ооцитов содержала витальные красители.

Таким образом, витальные красители первоначально появляются во вспомогательных клетках, а затем в ооцитах. Более позднее включение красителей в ооцитах может быть связано либо с медленным проникновением, либо с поступлением их из вспомогательных клеток. Второе предположение нам кажется более правильным, так как накопление красителей в ооцитах не зависит от наличия их в инкубационной среде.

О Б С У Ж Д Е Н И Е

Гонада морских ежей, помимо половых элементов, содержит вспомогательные клетки. На основании собственных наблюдений с наличием большого числа зон пролиферации в эпителии гонады, совпадающего с массовым образованием вспомогательных клеток при отсутствии связи полового тяжа с осевым органом, мы полагаем, что пополнение фонда вспомогательных клеток происходит за счет клеток целомического эпителия.

Количество вспомогательных клеток меняется от одной стадии полового цикла к другой. Этих клеток мало в преднерестовый период и много в начале репродуктивного цикла, что у *S. nudus* и *S. intermedius* наблюдается осенью, после сезона размножения. Именно в это время вспомогательные клетки активно включают H^3 -тимидин и, очевидно, пролиферируют. Зимой наблюдается достоверное снижение меченых ядер. По-видимому, в это время процессы размножения вспомогательных клеток замедляются. Полученные нами данные соответствуют исследованиям Holland and Giese (1965). Эти авторы так-

же отмечают включение предшественника во вспомогательные клетки *S. purpuratus* сразу после нереста и постепенное уменьшение числа меченых ядер в дальнейшем.

Вспомогательные клетки содержат мелкие, средние и крупные глобулы. На всех стадиях репродуктивного цикла мелкие преобладают над средними, а средние - над крупными. В каком отношении они находятся друг к другу, является ли каждая размерная группа самостоятельной или это переходные формы пока сказать трудно. Наши данные указывают на возможность самостоятельного образования каждой размерной группы, хотя исключить взаимные переходы их друг в друга полностью нельзя.

Большой интерес представляет химическая природа глобул. До настоящего времени их состав не установлен. Однако считают, что глобулы имеют сложную структуру, важным компонентом которой у *Strongylocentrotus purpuratus* являются нейтральные мукополисахариды (Holland and Giese, 1965). Изучение глобул у *Strongylocentrotus intermedius* и *S. midus* позволяет заключить, что базофильные глобулы являются рибонуклеопротеидом, а эозинофильные представляют комплекс, состоящий из белков, липидов и углеводов. В состав гетерогенных глобул входит тот и другой материал.

Возникает вопрос из чего же образуются глобулы? Проведенные микроскопические наблюдения за гонедой *S. midus* и *S. intermedius* позволяют считать основным источником глобул материал резорбирующихся половых клеток. После каждого нереста оставшиеся невышедшие половые клетки подвергаются резорбции. В это время вспомогательные клетки заполняются

морфологически неоднородным материалом. Помимо этого, у морских ежей залива Петра Великого зимой наблюдаются активные процессы резорбции ооцитов и одновременно усиленное образование глобул вспомогательных клеток, что также описано у других видов морских ежей: *S. purpuratus*, *Stereoclinus neumajeti* (Holland and Giese, 1965; Pearse and Giese, 1966).

Другим, не менее важным источником для формирования глобул, по-видимому, является кишечник. Очевидно, не случайно кишечник образует петли вокруг пяти долек гонады. Более того, между кишечником и гонадой наблюдается тесная анатомическая связь. Можно видеть, как клетки кишечного эпителия контактируют с поверхностным слоем гонады. По данным Lawrence et al. (1966), кишечник при обильном питании накапливает трофические вещества, которые способны передаваться в гонаду. Не исключена возможность образования глобул из питательного материала, доставляемого в гонаду целомической жидкостью или кровеносной системой.

В половой железе *S. nudus* и *S. intermedius* в период низкой температуры воды можно наблюдать интенсивные процессы резорбции. Очевидно, это нормальный физиологический процесс, необходимый для развития гонады. В местах резорбции наблюдается скопление вспомогательных клеток. Последние, оказавшись в зоне резорбции, утилизируют материал дегенерирующих ооцитов. Участие вспомогательных клеток в процессах резорбции говорит о важном значении этих клеток в гонадогенезе.

Во-первых, вспомогательные клетки являются промежуточным звеном между ооцитами двух генераций, что

можно выразить схематично: ревербирующий ооцит - вспомогательная клетка - расщепленный ооцит. Утилизируя материал дегенерирующих ооцитов, вспомогательные клетки аккумулируют питательный субстрат и передают его ооцитам следующей генерации. Биологический смысл этого явления заключается в способности вспомогательных клеток усваивать белки, липиды и полисахариды погибающих ооцитов, необходимые для нормального развития половых клеток, составляющих нерест.

Во-вторых, вспомогательные клетки посредством фагоцитоза, вероятно, определяют численный состав зрелых половых клеток гонады. Участие вспомогательных клеток гонады в репродукции, трофике и регуляции плодовитости описано у многих животных (Soos, 1911; Takatsuki, 1934; Loosanoff, 1937; Millet, 1937; Fateishi and Adachi, 1957; Selwood, 1968, 1970; Kobayashi and Konaka, 1971; Кудинский, 1973, 1974; Азарова, 1974).

В-третьих, вспомогательные клетки, вероятно, способны захватывать инородные частички, поступающие в гонаду извне. В связи с этим можно предполагать, что эти клетки играют важную роль в ликвидации чужеродных веществ. Учитывая это, можно считать вспомогательные клетки своеобразной микрофагальной системой и весьма важным защитным аппаратом гонады морского ска.

Рост ооцита обеспечивается различными клеточными элементами гонады и нередко клетками других органов и тканей (Zaffagnini, 1969; Hirsch and Cone, 1969; Yamamoto, 1971; Zurbib, 1973; Wolin et al., 1973). Немаловажную роль, по-видимому, играют вспомогательные клетки. Участие вспомога-

ных клеток в ооцитах необходимы для его роста питательными веществами обнаружено у многих беспозвоночных (Sirlin and Jacob, 1960; Vier, 1963, 1964; Raven, 1964; Frazelcska, 1966), в том числе и у морских ежей (Takashima, 1966 ; Takahana, 1971). Поступают ли белки, липиды, углеводы в РНН вспомогательных клеток в ооциты морских ежей? Помогательный ответ на этот вопрос позволяет заключить, что вспомогательные клетки являются источником питания и выполняют трофическую функцию. Наши наблюдения показывают, что в начале созревания вспомогательные клетки богаты трофическим материалом. По мере роста ооцитов количество трофических веществ во вспомогательных клетках начинает уменьшаться. Напротив, в ооцитах наблюдается мгновенное накопление дейтоплазматических включений. Электронно-микроскопическими наблюдениями установлены морфологические изменения вспомогательных клеток, связанные с перемещением частиц в межклеточное пространство и наличие митозов в ооцитах.

Поглощение витальных красителей ооцитами из вспомогательных клеток свидетельствует о возможности передачи и других веществ. Известно, что трипановый синий используют в качестве индикатора на белки (Telfer and Anderson, 1968; Wolin et al., 1973), нейтральный красный - на липиды, а синьку Эванса - на вещества углеводной природы (Пирс, 1962). На основании поступления витальных красителей в ооциты из вспомогательных клеток можно предполагать о перемещении из них в ооциты и трофических включений. Приведенный фактический материал в сопоставлении с литературными данными подтверждает наблюдение, что вспомогательные клетки гонады мор-

окого ежа являются основным источником трофических веществ для ооцитов и выполняют функции питания.

Поступление веществ в ооциты осуществляется различными путями. Jacques (1973) фagoцитоз и пиноцитоз характеризует как один из механизмов транспорта веществ в клетку. По данным Vier (1970), накопление и синтез белков в ооците осуществляются с помощью пиноцитоза. Механизм поступления веществ в ооцит путем микропиноцитоза различными методами изучен у многих животных (Anderson, 1964; Yamamoto and Oota, 1967; Schjeide et al., 1970; Huebner and Anderson, 1972; Ullmann, 1973) и описан у некоторых видов морских ежей (Tsukahara and Sugiyama, 1969).

Электронно-микроскопическими наблюдениями установлено, что поверхность ооцита на поздних этапах оогенеза становится многоостчатой. На периферии обнаруживаются пиноцитозные пузырьки диаметром 0,5-0,9 мкм с мелкозернистым содержимым внутри. Эти частицы идентифицированы как гликоген (Tsukahara, 1971). Кроме того, отмечается разрушение глобул и мембран вспомогательных клеток. Эти и некоторые другие факты свидетельствуют о передаче трофического материала в растущие ооциты у морских ежей путем пиноцитоза, хотя Verhey and Moyer (1967a) у этих животных не видели микропиноцитоза в поверхностном слое. Однако это не говорит о том, что пиноцитоз вообще отсутствует. Наши наблюдения показали, что пиноцитозная активность характерна для определенных стадий развития ооцитов. Tsukahara and Sugiyama (1969), изучая оогенез морских ежей, также наблюдали ультраструктурные изменения поверхности ооцита и отметили наличие микропиноцитозной активности.

На определенных стадиях развития половые клетки теряют

связь с базальной мембраной и располагаются в центре эцинуса среди вспомогательных элементов. Многочисленные отростки вспомогательных клеток направляются в сторону свободнолежащих ооцитов и контактируют с последними. Таким образом между клетками устанавливается тесная анатомическая связь. Мы считаем, что вспомогательные клетки, помимо всего, служат еще каркасом - интерстицием для свободнолежащих половых клеток и выполняют опорно-механическую функцию.

ВЫВОДЫ

1. В гонаде *Strongylocentrotus nudus* и *S. intermedius* имеются вспомогательные клетки, которые закономерно появляются, развиваются и в большинстве своем исчезают в каждом половом цикле. Морфология этих клеток меняется в зависимости от стадии развития гонады. Сразу после сезона размножения наблюдается массовое образование вспомогательных клеток, источником которых является наружный эпителиальный слой стенки гонады.

2. Численность вспомогательных клеток и соответственно площадь, занятая ими, на различных стадиях репродуктивного цикла неодинакова. Они появляются сразу после нереста и накапливаются до стадии "активного гаметогенеза". По мере роста и созревания половых элементов число вспомогательных клеток резко сокращается и перед нерестом они почти полностью исчезают.

3. Цитоплазма вспомогательных клеток в начале репродуктивного цикла заполняется морфологически неоднородным материалом, который оформляется в виде мелких, средних и крупных глобул. Мелкие преобладают над средними, средние - над круп-

ными. Мелкие и средние глобулы в различном количестве имеются в течение года, крупные - только с ноября по май.

4. Вспомогательные клетки содержат три типа глобул: базофильные, гомогенные с электронноплотным содержимым; базофильные, состоящие из глыбок высокой электронной плотности, и гетерогенные, содержащие сложные гранулы из электронноплотных частиц и пластинчатых тел.

5. Число глобул на протяжении репродуктивного цикла непостоянно. Их количество максимально увеличивается зимой, что является следствием массовой разорбции оситов. Весной, в период активного гаметогенеза, численность глобул уменьшается и к окончанию созревания половых клеток их почти не остается.

6. В глобулах выявляются белки, липиды, полисахариды и РНК. Исследование протеинов показало, что вспомогательные клетки содержат главным образом кислые белки. Из липидов обнаружены фосфолипиды и нейтральные жиры. Углеводные включения представлены преимущественно нейтральными полисахаридами и гликогеном.

7. Морфологическими, цитохимическими и автордиографическими методами показано, что базофильные глобулы являются рибонуклеопротеидом, а эозинофильные представляют комплекс, состоящий из белков, липидов и полисахаридов. Гетерогенные глобулы содержат материал глобул I и II типов.

8. Содержание трофических веществ во вспомогательных клетках меняется на протяжении репродуктивного цикла. Вспомогательные клетки особенно богаты белками, липидами, углеводами и РНК на стадии "начало развития". С наступлением "преднеростовой" стадии содержание этих веществ во вспомогательных клетках снижается одновременно с уменьшением количества гло-

бул. Неполные и сокращенные трофические включения во вспомогательных клетках, в связи их развития и инволюция коррелирует с началом созревания, раском и созреванием яйцеклеток.

9. Авторадиотрофические исследования с H^3 -тимидином показали, что соразмерно вспомогательным клеткам развивается в основном на стадии "последней митозисной", вследствие включения H^3 -урядина свидетельствует об интенсивном процессе синтеза, происходящем во вспомогательных клетках развивается корреляция между соматической активностью вспомогательных и половых клеток.

10. Опыты с vitalными красителями свидетельствуют о возможной передаче трофического материала из вспомогательных клеток в ооциты.

11. Вспомогательные клетки гонады морского ежа выполняют следующие функции: защитную-фагоцитарную, трофическую, опорную и регулируют число созревающих половых клеток.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Вараксина Г.С., Гнездилова С.М., Евдокимов В.В., Новикова Г.П., 1974. Сезонная характеристика и экспериментальная регуляция гаметогенеза у иглокожих. В об.: Биология морских моллюсков и иглокожих. Владивосток, 25-29.

2. Varakchina G.S., Gnesdilova S.M., Evdokimov V.V. and Novikova G.P. 1974. Seasonal characteristics and experimental regulation of gametogenesis in Echinodermata. Soviet-Japanese symposium on the biology of marine molluscs and echinoderms. Nakhodka: 84.

3. Вараксина Г.С., 1974. Цитохимическая характеристика и электронная микроскопия вспомогательных клеток гонады морских

ежой. Вторая Всесоюзная конференция молодых ученых по вопросам сравнительной морфологии и экологии животных. М., "Наука": 90-91.

4. Бараксина Г.С., Ващенко М.А., Гнездилова С.М., 1975. Овогенез и половой цикл у плоского морского ежа *Scapheschinus griseus* на шельфе залива Петра Великого (Японское море). Всесоюзная конференция по биологии шельфа. Владивосток: 23.

5. Бараксина Г.С., Ващенко М.А., Новикова Г.И., 1977. Сравнительная характеристика половых циклов у иглокожих залива Петра Великого (*Strongylocentrotus nodus*, *S. intermedius*, *Scapheschinus griseus*, *Asterias amurensis*, *Patiria pectenifera*). В сб.: Систематика, эволюция, биология и распространение современных и вымерших иглокожих. Л.: 13-14.

6. Бараксина Г.С., Мамрова Е.С., Бараксин А.А., 1978. Нейроэндокринная регуляция гаметогенеза и нереста у иглокожих. В сб.: Седьмое научное совещание по эволюционной физиологии, посвященное памяти академика Леона Абгаровича Орбели. Л.: 44-45.

Бараксин

ВАРАКСИНА Галина Степановна

ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК
ГОНАДЫ МОРСКИХ ЕЖЕЙ *STRONGYLOCENTROTUS NUDUS*
И *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS*

ВД 12608. Подписано к печати 25/УП 1978г. Формат 60x84/16.

Тираж 100 экз. Усл. печ. л. 1,4. Уч.-изд. л. 1,1

Заказ 19. Бесплатно

Отпечатано на ротапринтере ДВНЦ АН СССР

Владивосток, Ленинская, 50