

University of Groningen

**Effects of testosterone on kidney structure and hydromineral regulation in the teleost  
Gasterosteus aculeatus L.**

de Ruiter, Anne Johannes Hein

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1980

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

de Ruiter, A. J. H. (1980). Effects of testosterone on kidney structure and hydromineral regulation in the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. Groningen: Stichting Drukkerij C. Regenboog

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## H E T O N D E R Z O E K

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek heeft vooral betrekking op de veranderingen in de water- en ionenhuishouding die optreden gedurende de voortplantingsperiode van mannelijke driedoornige stekelbaarzen in zoet water. Zoals reeds is vermeld, worden de nieren bij dit dier grotendeels omgevormd tot een orgaan dat slijm produceert voor de nestbouw.

Al in 1885 werd door Möbius beschreven dat het slijm, dat het mannetje van de aan de driedoorn nauwverwante zeestekelbaars (*Spinachia spinachia*) gebruikt voor de nestbouw, geproduceerd wordt in de nieren. Bij de driedoornige stekelbaars nemen de nieren ongeveer 7-voudig in omvang toe. Het worden bleekroze, sterk gezwollen organen, in plaats van de smalle, donkerrode organen zoals die bij niet-rijpe mannetjes en bij vrouwtjes te vinden zijn. Dit is een gevolg van zeer ingrijpende veranderingen die zich voltrekken in het nierbuis-epitheel. In 1924 werd door van Oordt vastgesteld dat bij de tiendoornige stekelbaars (*Pungitius pungitius*) de nieren zich niet tot slijmvormende organen ontwikkelden wanneer de dieren gecastreerd werden. Craig-Bennet (1931) constateerde dat bij de driedoornige stekelbaars de veranderingen in de nieren gecorreleerd zijn met een toename in de omvang van het interstitiële weefsel in de testes, de plaats waar het mannelijke hormoon gevormd wordt. Uit experimenten waarbij aan castraten mannelijk geslachtshormoon werd toegediend, kon tenslotte definitief worden geconcludeerd dat dit hormoon, direkt of indirekt, verantwoordelijk is voor de structurele veranderingen die plaatsvinden in de nierbuizen van rijpende mannelijke stekelbaarzen (Wai en Hoar, 1963; Mourier, 1972). Wai en Hoar (1963) stelden bovendien vast, dat soortgelijke veranderingen ook in de nieren van vrouwelijke dieren teweeg kunnen worden gebracht door testosteron injecties. Dit hormoon is tevens direkt betrokken (al of niet in samenwerking met gonadotroop hormoon) bij de regulatie van het voortplantingsgedrag van de mannelijke stekelbaars (Hoar, 1962; Baggerman, 1966, 1968).

Het fenomeen dat nierbuiszellen onder invloed van androgenen omgevormd kunnen worden in slijmsecernerende cellen komt niet alleen voor bij stekelbaarzen maar is ook beschreven voor andere lagere vertebraten zoals hagedissen en slangen (DeI Conte, 1972). De betekenis hiervan voor deze dieren is echter veel minder duidelijk.

Gezien de grote rol die de nieren spelen bij de hydrominerale regulatie, moet deze transformatie tot slijmvormend orgaan grote gevolgen hebben voor de wijze waarop de geslachtsrijpe mannelijke stekelbaarzen zich weten te handhaven in

zoet  
in d  
1. W  
n  
2) V  
t  
v  
3) W  
er  
De  
in di  
labyr  
sorbe  
nepro  
worde  
om de  
de me  
Beyen  
kunne  
gaan  
slach  
is va  
ander  
zelf  
zoet  
al s  
gead  
dier  
Bij  
(Hen  
zing  
het  
lang  
dier  
zout  
de

zoet water. De belangrijkste doelstellingen van het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift houden hiermee dan ook verband en luiden als volgt:

1. Wat zijn de structurele veranderingen die optreden in de glomeruli en nierbuizen tijdens de voortplantingsperiode van de mannelijke stekelbaars?
- 2) Vinden deze veranderingen plaats als direkt gevolg van de verhoogde testosteron-spiegel in het geslachtsrijpe mannetje of is hier sprake van een indirekt effect?
- 3) Wat zijn de gevolgen van deze structurele veranderingen voor de water- en ionenregulatie van het dier?

De verandering van nierbuis-cellen in slijm secernerende cellen gaat, zoals in dit proefschrift wordt aangetoond, gepaard met het verdwijnen van het basale labyrint en dus met het vermogen van de nierbuis-cellen om ionen terug te resorberen. Dit zou tot een groot verlies van ionen kunnen leiden wanneer de urineproductie - en dus ook de glomerulaire filtratiesnelheid - niet sterk zou worden verminderd in geslachtsrijpe mannetjes. Daarom is gezocht naar methoden om de GFR te kunnen meten. Omdat de GFR met de voor hogere vertebraten geëigende methoden in stekelbaarzen niet of nauwelijks te bepalen is (Lam, 1969; Beyenbach en Kirschner, 1976) is een andere methode gebruikt om uitspraken te kunnen doen over de GFR in de stekelbaars. Dit is ondermeer gedaan door na te gaan of er veranderingen optreden in de structuur van de glomeruli bij de geslachtsrijpe mannetjes. Dit onderzoek wordt beschreven in Hoofdstuk I. Hierbij is van de gedachtengang uitgegaan dat, indien er inderdaad structurele veranderingen zouden plaatsvinden in de glomeruli van rijpende dieren, deze in dezelfde richting zouden moeten gaan als die welke optreden bij de overgang van zoet naar zout water. Immers in aan zeewater geadapteerde vissen is de GFR veelal sterk verlaagd. Ook onze metingen van de urine-productie van aan zeewater geadapteerde stekelbaarzen (zie Hoofdstuk IV) wijzen erop dat de GFR van deze dieren aanmerkelijk lager is dan die van aan zoet water geadapteerde dieren. Bij de driedoornige stekelbaars (Wendelaar Bonga, 1973) en de zeestekelbaars (Hentschel, 1977) als ook bij andere vissen (Hickman en Trump, 1969) zijn aanwijzingen gevonden dat er een relatie bestaat tussen GFR en de ultrastructuur van het glomerulus. Daarom is de structuur van de glomeruli bestudeerd. Er zijn belangrijke structurele verschillen gevonden tussen de glomeruli van niet-rijpe dieren in zoet water enerzijds en die van a) rijpe mannelijke dieren en b) aan zout water aangepaste dieren anderzijds. Bij de laatstgenoemde twee groepen is de diameter van het kapsel van Bowman en van het glomerulus kleiner. Ook het aan-

NIET-GESLACHTSRIJP

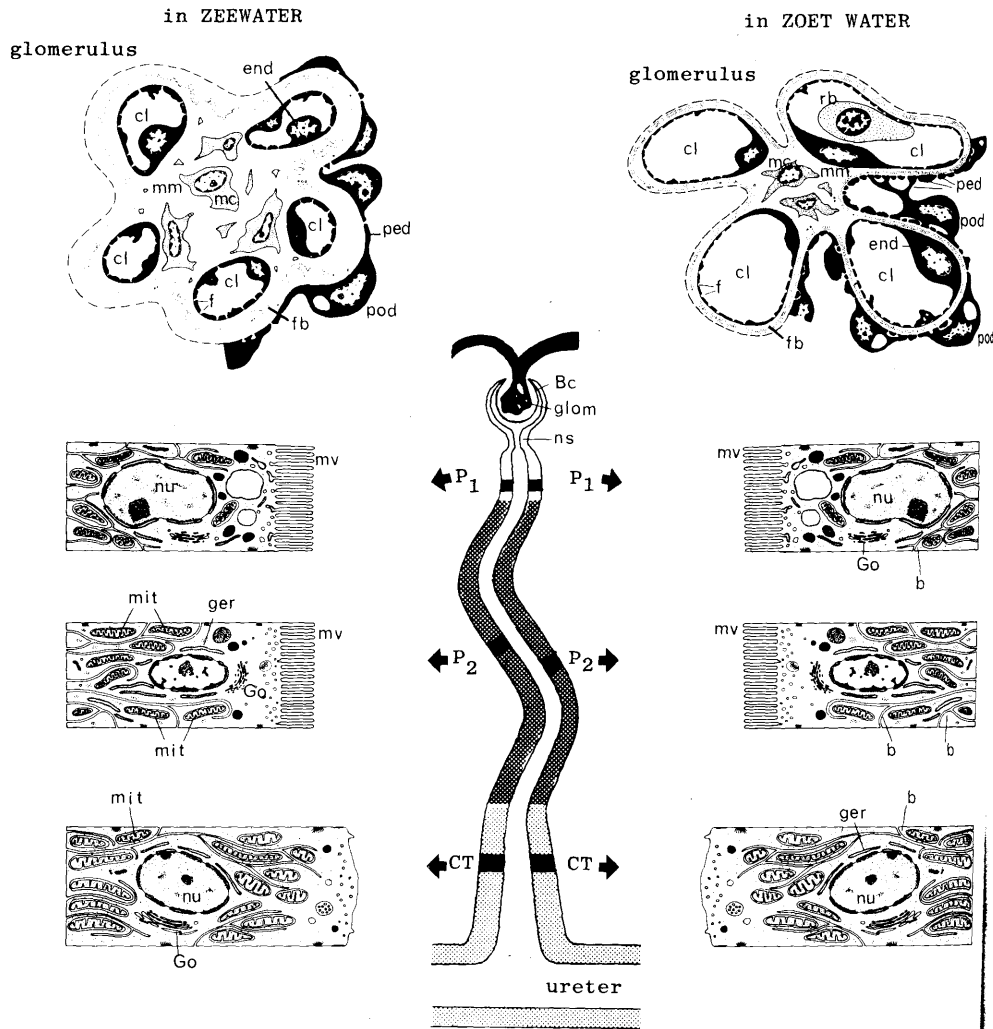


Fig. 1. Schematische weergave van een nefron uit de nieren van niet-geslachtrijpe aan zeewater (links) en aan zoet water (rechts) geadapteerde stekelbaarzen. Van het glomerulus (*glom*) in zoetwater dieren zijn de capillaire lumina (*cl*) en het aantal poriën (*f*) in het endotheel (*end*) groter, terwijl de filtratie barrière (*fb*) dunner is. Ook zijn de mesangium cellen (*mc*) en de door deze cellen gevormde mesangiale matrix (*mm*) minder sterk ontwikkeld en is het aantal pedicellen (*ped*), waartussen zich de filtration-slit-membranes bevinden, groter in zoetwaterdieren. Van elk van de drie belangrijkste tubulus segmenten van het nefron is een cel in detail op EM-nivo weergegeven; *Bc* kapsel van Bowman; *ns* nek segment; *P<sub>1</sub>* eerste proximale segment; *P<sub>2</sub>* tweede proximale segment; *CT* verzamelbuis; *b* basaal labyrinth; *mit* mitochondrion; *nu* kern; *Go* Golgi apparaat; *pod* podocyt; *rb* rode bloedcel; *ger* ruwwandig endoplasmatisch reticulum

glomerulus

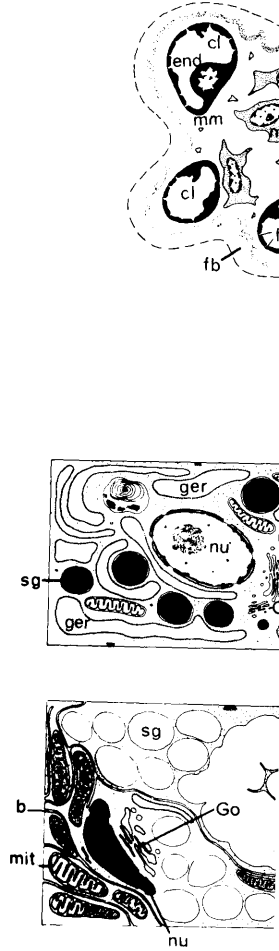
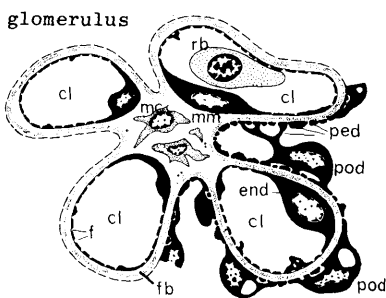


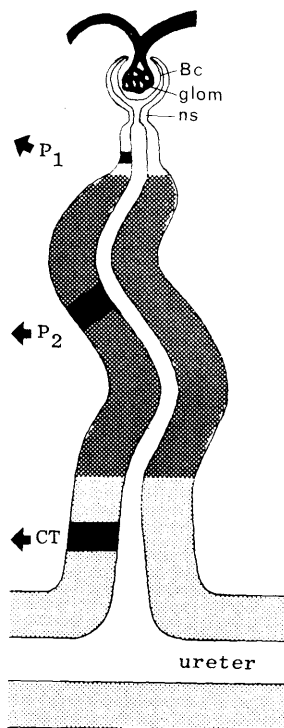
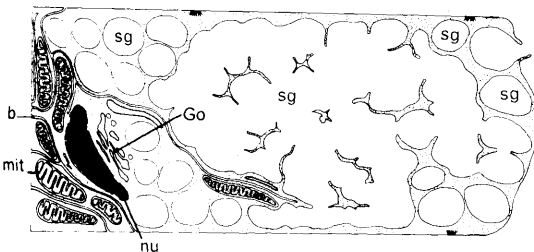
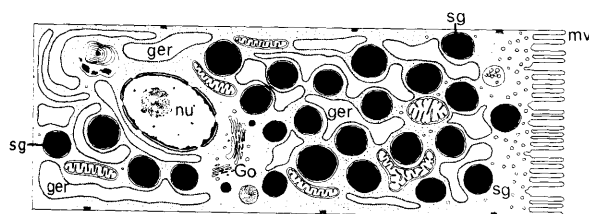
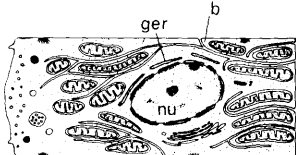
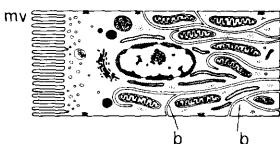
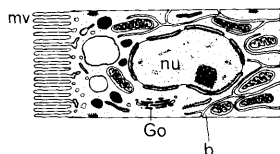
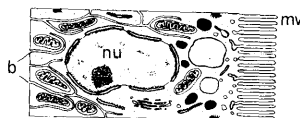
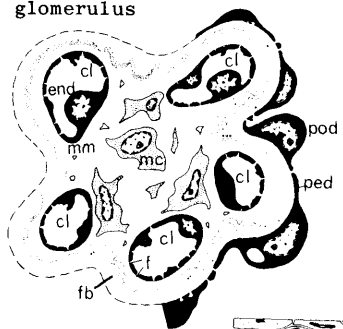
Fig. 2. Schematische weergave van de nefron van een niet-geslachtrijpe stekelbaarze. De afbeelding toont grote overeenkomsten met de afbeelding van de stekelbaarze die is geadapteerd aan zeewater (Fig. 1), met uitzondering van het tweede proximale labyrint (*b*) dat sterk gereduceerd is. Het cunula (*sg*) en de celorganellen (*Go*) zijn in de niet-rijpe dier (P<sub>1</sub>) blijven onveranderd

GESLACHTSRIJP ♂  
in ZOET WATER

in ZOET WATER



glomerulus



uit de nieren van niet-geslachtsrij-  
chts) geadapteteerde stekelbaarzen.  
zijn de capillaire lumina (cl) en  
groter, terwijl de filtratie bar-  
ellen (mc) en de door deze cellen  
ontwikkeld en is het aantal pedi-  
lit-membranes bevinden, groter in  
ijkste tubulus segmenten van het ne-  
ven; Bc kapsel van Bowman; ns nek  
de proximale segment; CT verzamel-  
nu kern; Go Golgi apparaat; pod  
plasmatisch reticulum

**Fig. 2.** Schematische weergave van een nefron uit de nieren van geslachtsrijpe man-  
nelijke stekelbaarzen in zoet water. De structuur van het glomerulus (*glom*) ver-  
toont grote overeenkomst met die van zeewaterdieren. Van elk van de drie hoofd-  
segmenten van het nefron is een cel in detail op EM-nivo getekend, op dezelfde  
schaal als in Fig. 1, om de toename in celomvang te demonstreren. In de cellen  
van het tweede proximale segment (*P<sub>2</sub>*) en van de verzamelbuizen (*CT*) is het ba-  
sale labyrinth (*b*) nagenoeg geheel verdwenen en het aantal mitochondriën (*mit*)  
sterk gereduceerd. Het cytoplasma is bijna uitsluitend gevuld met secretie gra-  
nula (*sg*) en de celorganellen, die bij de vorming hiervan betrokken zijn, zoals  
het Golgi apparaat (*Go*) en het ruwwandig endoplasmatisch reticulum (*ger*). Deze  
celorganellen zijn in de *P<sub>2</sub>*- en de *CT*-cellen veel sterker ontwikkeld dan in die  
van de niet-rijpe dieren (Fig. 1). De cellen van het eerste proximale segment  
(*P<sub>1</sub>*) blijven onveranderd. Voor overige legenda zie Fig. 1.



airen bekleedt en de diameter van de arteriële vaat heeft zich sterk ontwikkeld. Aan de podocyten zijn aanmerkelijke "filtration slits" tussen de pedicels te zien (zie figuur 1 en 2). Al deze veranderingen duiden erop dat de glomerulaire doorbloeding is verlaagd, wat tot een verlaagde GFR tot gevolg heeft. Dit kan beantwoorden, of de hierboven beschreven veranderingen in de arteriële vaat het directe gevolg zijn van de ziekte. Het feit dat de ziekte kon niet worden uitgesloten bij de mannetjes de secretie van een aantal proteïnen deze structuren zou kunnen veranderen. Het is denkbaar, vanwege de betrokkenheid van de glomerulatie. Daarom is besloten de in de culturen van de cellen van de glomerulaire veranderingen te houden. Uit de resultaten van de invloed van androgenen plaatsvindt het meest waarschijnlijk bepaald door twee geheel verschillende spiegels in het bloed en de plaats van de ziekte zich bevindt.

De veranderingen in de glomerulus (glomerulosclerose), zoals bijvoorbeeld bij de rat en de mens, worden genoemd glomerulaire veranderingen. Het feit dat komen deze glomerulaire afwijkingen bij alle individuen. Het feit dat de ziekte experimenteel sneller te induceren is bij de mens, reversibel zijn, doet denken aan een onderzoeksmodel zou kunnen worden gebruikt.

De schrijver heeft die plaatsvinden in de veranderingen van de cellen beschreven. Deze veranderingen benoemen als de opbouw van de cellen (Fig. 2). In dit hoofdstuk wordt

met name de invloed nagegaan - op licht - (LM) en elektronenmikroskopisch (EM) nivo - van het androgeen methyltestosteron op de nierbuis-cellen van gecastreerde mannelijke dieren. De resultaten worden vergeleken met de effecten van methyltestosteron en 11-ketotestosteron op de nierbuis-cellen in gekweekt nierweefsel. In alle gevallen blijken veranderingen in de nierbuis-cellen op te treden, die sterk overeenkomen met die welke zich voordoen bij geslachtsrijpe mannetjes. Deze veranderingen doen zich voor in de cellen van het tweede proximale segment ( $P_2$ ) en de verzamelbuizen (CT) (zie figuur 1 en 2). Zowel de celhoogte als de kerngrootte neemt toe. Tevens zijn in het cytoplasma talrijke secretiegranula te zien. Op EM-niveau blijkt dat er een uitbreiding en opzwellen van het ruw endoplasmatisch reticulum (GER) heeft plaatsgevonden en dat de Golgi apparaten sterk ontwikkeld zijn. Al deze veranderingen laten zien dat deze cellen secretorisch zeer actief zijn. Het slijmachtige produkt dat de  $P_2$ -cellen vormen blijkt te verschillen van dat wat door de CT-cellen wordt gevormd. Het slijm uit de  $P_2$ -cellen bestaat uit glycoproteïnen en dat uit de CT-cellen uit mucopolysachariden (Hentschel, 1973; Wendelaar Bonga, persoonlijke mededeling). Uit de resultaten van de orgaankweek blijkt verder nog dat 11-ketotestosteron, waarvan is aangetoond dat het van nature in vissen voorkomt (Arai, 1967), een sterker effect heeft dan het synthetische methyltestosteron. Uit de gegevens van Hoofdstuk III wordt de conclusie getrokken dat het mannelijk geslachtshormoon een directe invloed uitoefent op de structuur van het nierbuis-epitheel.

De waargenomen veranderingen tonen aan dat de tot kliercellen getransformeerde nierbuis-cellen nauwelijks meer van betekenis kunnen zijn voor de hydrominerale huishouding. Dit betekent dat in geslachtsrijpe mannetjes ongeveer 90% van alle nierbuis-cellen het vermogen om ionen op te nemen uit de voor-urine vrijwel geheel verliest (zie ook Hoofdstuk VI).

Doordat de GFR van deze dieren laag is zal ook de urineproductie waarschijnlijk laag zijn. Geslachtsrijpe mannetjes beschikken dus over een mechanisme om een hoog ionenverlies via de urine-afgifte te beperken. Hiermee gaat echter een belangrijk mechanisme, om het te veel aan osmotisch binnengedrongen water weer kwijt te raken, verloren. De resultaten van het onderzoek, beschreven in Hoofdstuk IV, laten zien dat dit dier echter over alternatieve mogelijkheden beschikt om water uit te scheiden.

In de eerste plaats wordt water afgevoerd via het slijm dat in de nierbuizen gevormd wordt. In de tweede plaats is gebleken dat in rijpe mannelijke stekel-

baarzen een verhoogde vloeistofsecretie door de darm plaatsvindt. Met betrekking tot dit laatste punt rijst de vraag waar dat darmvocht vandaan komt. Om deze vraag te beantwoorden is elektronenmikroskopisch onderzoek verricht aan de darmepitheelcellen (Hoofdstuk V) om na te gaan of er in deze cellen een structurele basis aanwezig is voor secretie van vloeistoffen door deze cellen vanuit het bloed naar het darmlumen. Zoals uit de resultaten van dit hoofdstuk blijkt beschikken de epitheelcellen over de gehele lengte van de darm over een basaal labyrint. Ook zijn er aanwijzingen gevonden dat de vloeistofsecretie in het voorste gedeelte van de darm groter is en mogelijk zelfs tot dit gedeelte van de darm beperkt is. Om de secretie van vloeistof via de darm nader te onderzoeken is ook de osmotische waterpermeabiliteit van de darmwand bepaald (Hoofdstuk IV). Het is gebleken dat deze in de richting van het bloed naar het darmlumen verhoogd is in geslachtsrijpe mannelijke stekelbaarzen. Op basis van al deze resultaten wordt in Hoofdstuk V een model beschreven voor de vorming van darmvloeistof. Dit model is gebaseerd op de standing gradient - osmotische theorie (zie pag. 77). Volgens dit model zou de verhoogde darmvloeistofproductie bij rijpe mannetjes moeten samengaan met een toename van het actieve ionentransport over het darmepitheel. In het onderzoek dat wordt beschreven in Hoofdstuk VI is daarom met behulp van biochemische methoden nagegaan of in de darm van deze mannetjes een verhoogde activiteit van het  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, een bij actief ionentransport betrokken enzym, aantoonbaar is. Dit zou kunnen wijzen op een verhoogd  $\text{Na}^+$ -gekoppeld water-transport. Een verhoging van de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase-activiteit is echter niet gevonden. Daarentegen is wel een verhoging gevonden van de activiteit van het  $\text{Mg}^{++}$ ATPase. Deze verhoging is het duidelijkst in het voorste deel van de darm, daar waar ook de grootste structurele verschillen zijn waargenomen (zie Hoofdstuk V). Omdat de functie van het  $\text{Mg}^{++}$ ATPase nog onduidelijk is, kan over de betekenis hiervan nog weinig worden gezegd.

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt tevens dat de activiteit van zowel het  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - als het  $\text{Mg}^{++}$ ATPase sterk verlaagd is in de nieren van rijpe mannetjes. Deze daling is in overeenstemming met het feit dat het grootste gedeelte van het basale labyrint, waar deze enzymen gelokaliseerd zijn (Flik et al., 1980), is verdwenen. In de kieuwen van het geslachtsrijpe mannetje zijn geen belangrijke veranderingen gevonden.

De resultaten van het onderzoek dat wordt beschreven in dit proefschrift leiden tot de conclusie dat in de nieren van geslachtsrijpe mannelijke stekelbaarzen, als direkt gevolg van testosteron, ingrijpende structurele veranderingen

en optreden, die de water- en ionenking tot de waternamelijk in de darm. Uit dit onderzoek blijkt dat rijpe mannetjes zijn aangepast. Dit in de functie van de de voorjaarstrek hoeven te veranderen.

#### LITERATUUR

- Arai, R.: Androgenics in the testis.  
 Baggerman, B.: Androgenic activity in the threespined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 12, 105-317 (1978).  
 Baggerman, B.: Osmotic regulation of the threespined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 20, 427-456 (1976).  
 Baggerman, B.: Hormonal regulation of the threespined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. In: "Perspectives in Fish Physiology", ed. by Jørgensen, eds. Academic Press, New York, 1972.  
 Berridge, M.J., Osmotic regulation of the threespined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 20, 427-456 (1976).  
 Beyenbach, K.W., Osmotic regulation of the threespined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 20, 427-456 (1976).  
 Biether, M.: Die Osmotische Regulation der Threespined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, (1970).  
 Conte, F.P.: Salt and Water Balance. In: "Salt and Water Balance", ed. by Randall, eds. Academic Press, New York, 1972.  
 Craig-Bennet, A.: Osmotic Regulation of the Threespined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 192 (1972).  
 Del Conte, E.: Growth and Development of the Threespined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 192 (1972).  
 Diamond, J.M., Osmotic Regulation of the Threespined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 2061-2083 (1976).  
 Diamond, J.M., Osmotic Regulation of the Threespined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 2061-2083 (1976).  
 Dibaba, D.R., Osmotic Regulation of the Threespined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, 2061-2083 (1976).



en optreden, die aanzienlijke gevolgen hebben voor de functie van de nieren bij de water- en ionenhuishouding. De hieruit voortvloeiende problemen met betrekking tot de waterbalans worden deels in de nier zelf en deels daarbuiten, namelijk in de darm, "opgelost".

Uit dit onderzoek blijkt verder dat de structuur en functie van glomeruli van rijpe mannetjes sterk lijken op die van stekelbaarzen die aan zeewater zijn geïmpliceerd. Dit impliceert dat, onder natuurlijke omstandigheden, de structuur en functie van de glomeruli in de nieren van mannelijke stekelbaarzen tijdens de voorjaarstrek vanuit zee naar de paaiplaatsen in zoet water nauwelijks behoeven te veranderen, in tegenstelling tot die van de wijfjes.

#### LITERATUUR

- Arai, R.: Androgenic effects of 11-ketotestosterone on some sexual characteristics in the teleost, *Oryzias latipes*. Annot. Zool. Jap. 40, 1-5 (1967)
- Baggerman, B.: An experimental study on the timing of breeding and migration in the threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). Arch. Neerl. Zool. 12, 105-317 (1957)
- Baggerman, B.: On the endocrine control of reproductive behaviour in the male threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). Symp. Soc. Exp. Biol. 20, 427-456 (1966)
- Baggerman, B.: Hormonal control of reproductive and parental behaviour in fish. In: "Perspectives in Endocrinology", (E.J.W. Barrington and C. Barker Jørgensen, eds.) p. 351-404, London, New York: Academic Press 1968
- Berridge, M.J., Oschman, J.L.: Transporting epithelia. New York, London: Academic Press 1972
- Beyenbach, K.W., Kirschner, L.B.: The unreliability of mammalian glomerular markers in teleostean renal studies. J. Exp. Biol. 64, 369-379 (1976)
- Biether, M.: Die Chloride Zellen des Stichlings, Z. Zellforsch. 107, 421-446 (1970)
- Conte, F.P.: Salt secretion. In: Fish physiology, Vol. 1 (W.S. Hoar and J.D. Randall, eds.), pp. 241-292. New York, London: Academic Press 1969
- Craig-Bennet, A.: The reproductive cycle of the threespined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., Phil. Trans. Roy. Lond. Soc., B219, 197-219 (1931)
- Del Conte, E.: Granular secretion in the kidney sexual segments of female lizard, *Cnemidophorus l. lemniscatus* (Sauria, Teiidae). J. Morphol. 137, 181-192 (1972)
- Diamond, J.M., Bossert, W.H.: Standing-gradient osmotic flow: a mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. J. Gen. Physiol. 50, 2061-2083 (1967)
- Diamond, J.M., Bossert, W.H.: Functional consequences of ultrastructural geometry in "backwards" fluid-transporting epithelia. J. Cell Biol. 37, 694-702 (1968)
- Dibona, D.R., Mills, J.W.: Distribution of Na<sup>+</sup>-pump sites in transporting epithelia. Fed. Proc. 38, 134-143 (1979)