

УДК 612.4.09

СОСТОЯНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА СЕМЕННИКОВ КРЫС ПОСЛЕ ЭПИФИЗЭКТОМИИ

Слесарева Е. В., Слесарев С. М., Арав В. И., Ляпейкова О. В.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия (432017, Ульяновск, ул. Арх. Ливчака д.2), e-mail: gistology@ulsu.ru

У интактных и эпифизэктомированных самцов белых крыс проведен анализ динамики площади сечения капилляров семенников в течение двух суток. Эпифизэктомия выполнялась по авторской методике. Анализ состояния микроциркуляторного русла оценивали спустя 40 суток после эпифизэктомии, когда влияние факта оперативного вмешательства становится незначимым. У интактных и эпифизэктомированных животных определяли площадь сечения и количество капилляров в 100 полях зрения в каждую временную точку. У интактных животных выявлен циркадианный ритм динамики площади сечения капилляров с максимальными значениями кровенаполнения органа в ночные часы, что коррелирует с динамикой активности эндокринной ткани семенников. Отсутствие биоактивных веществ эпифиза в кровотоке в течение 40 суток вследствие эпифизэктомии привело к исчезновению циркадианного ритма динамики площади сечения капилляров и рассогласованию кровенаполнения органа со свето-темновым циклом, увеличению количества сосудов микроциркуляторного русла в среднем на 19 % и росту средней площади сечения капилляров.

Ключевые слова: семенники, циркадианный ритм, микроциркуляторное русло, эпифизэктомия.

THE STATE OF THE MICROCIRCULATORY BED OF RATS TESTES AFTER PINEALECTOMY

Slesareva E. V., Slesarev S. M., Arav V. I., Lyapeykova O. V.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia (432 017, Ulyanovsk, st. Arch. Livchak, 2), e-mail: gistology@ulsu.ru

In intact males white rats, and males white rats after the pinealectomy analyze of the dynamics of cross-sectional area of the testes capillaries was performed in two days. Pinealectomy was performed by the author's methodology. Analysis of the microvasculature state was assessed after 40 days after pinealectomy, when the fact of the influence of surgical intervention becomes insignificant. In intact animals, and animals after the pinealectomy was measured the cross-sectional area and the number of capillaries in 100 fields of view at each time point. In intact animals was revealed a dynamics circadian rhythm of cross-sectional area of capillaries with the maximum values in the body's blood supply in the night hours, which correlates with the dynamics of the activity of the testes endocrine tissue. The absence of bioactive substances in the bloodstream in the pineal gland within 40 days, because of the pinealectomy, led to the disappearance of circadian rhythm dynamics of capillaries cross-sectional area and mismatch of the body's blood supply with the dark-light cycle. Also it led to the increasing of the number of microvascular an average of 19% and an increase of the average cross-sectional area of capillaries.

Key words: testis, circadian rhythm, the microcirculatory bed, pinealectomy.

Введение

Накопленные в настоящее время экспериментальные и клинические данные не вызывают сомнения в том, что изменения ритмов внешней среды являются факторами, обуславливающими устойчивые морфологические и физиологические изменения в организме. Рассогласование биоритмов организма и природных факторов предшествует развитию патологических состояний с последующими информационными, энергетическими, обменными и структурными изменениями. В основе десинхронизации лежит рассогласование существующих в норме периодов и фаз ритмов физиологических систем

организма и внешней среды (внешняя десинхронизация), а также фазовых взаимоотношений ритмов внутри организма (внутренняя десинхронизация). Десинхроноз как основная форма хронопатологии является первым признаком любого физиологического дискомфорта, который всегда возникает при стрессовых ситуациях.

К настоящему времени показано, что циркадианные ритмы активности свойственны большинству функциональных систем организма [5]. В то же время генетически передается только способность к формированию циркадианной ритмичности. Синхронизирующими факторами для формирования ритмов являются как смена светлого и темного времени суток, так и изменение продолжительности фотопериода. В предыдущих работах нами были выявлены циркадианные ритмы процесса сперматогенеза и активности эндокринной ткани семенников и показана роль эпифиза в их регуляции [3, 6]. Наличие циркадианной ритмичности содержания гонадотропных гормонов и тестостерона в крови [9] позволяют предположить и наличие суточного ритма кровенаполнения гонад, который должен коррелировать с основными выявленными ритмами активности гонад.

Целью данной работы явилось изучение состояния микроциркуляторного русла семенников в течение суток и роль эпифиза в регуляции микроциркуляции в гонадах.

Материалы и методы. Опыт выполнен на 180 самцах беспородных белых крыс массой 160–200 г. Животные в течение 20 дней адаптировались к 12 часовому режиму освещенности (освещение с 6 до 18 ч). На всем протяжении опыта доступ к пище и воде был свободным. Для изучения хроноструктуры микроциркуляторного русла семенников и роли эпифиза в его регуляции по истечении адаптационного периода крысы были разделены на две экспериментальные группы: интактные контрольные ($n = 90$) и эпифизэктомированные ($n = 90$). Эпифизэктомия проводилась по оригинальной методике [2]. Все болезненные манипуляции с животными выполняли согласно приказу № 755 от 12 августа 1977 г. по МЗ СССР “О гуманном обращении с экспериментальными животными”. Наркоз осуществлялся путем внутрибрюшинного введения тиопентала натрия в дозе 50 мг/кг. Выживаемость животных после операции составила 68 %. Эпифизэктомированных животных продолжали содержать при режиме освещенность/темнота равном 12/12 (освещение с 6 до 18 ч). Животных с неудовлетворительным состоянием, выражающемся в нарушении координации движений, уменьшении веса, нарушениях функций кишечника, с воспалительными процессами, в эксперименте в дальнейшем не использовали.

Эксперимент проводился в период с февраля по апрель. Выведение животных из эксперимента производили под эфирным наркозом на 40 – 41-й день после эпифизэктомии через каждые три часа в течение двух суток, что обеспечивало исследование функциональной активности микроциркуляторного русла и эндокринной ткани семенников

на протяжении двух периодов циркадианного ритма. В каждую временную точку эксперимента входило по 6 животных контрольной и опытной групп.

Семенники фиксировали в забуференном формалине и по стандартной гистологической методике изготавливали парафиновые поперечные срезы толщиной 5 мкм. Для морфологического определения количества и диаметра капилляров после депарафинирования срезы окрашивали ШИК-реакцией с доокрашиванием ядер гематоксилином (рис.1).

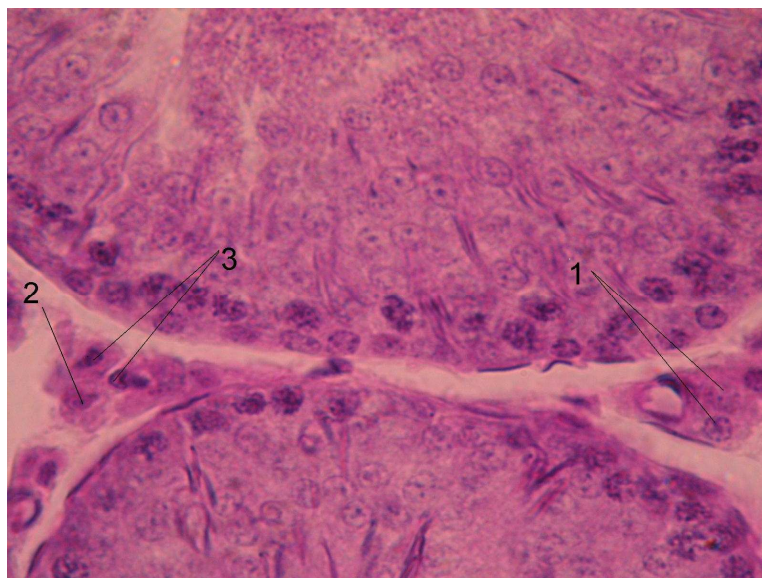


Рис. 1. Интерстициальная ткань и извитые каналцы семенника крыс.
Окраска ШИК-реакцией и гематоксилином, ув. 1000.

Видны просветы двух капилляров (поперечный срез), 1 – активные эндокриноциты, 2,3 – неактивные эндокриноциты

Измерения производились с помощью автоматизированной системы обработки и анализа изображений, состоящей из микроскопа Биолам-И, цифровой фотокамеры Nikon COOLPIX 995, персонального компьютера Pentium-IV и программы Mecos C-1 в 100 полях зрения. Статистическую обработку результатов проводили с использованием метода Фишера – Стьюдента. Уровень значимости был принят $P < 0,05$.

Выявление биоритмов функционального состояния капилляров микроциркуляторного русла семенников осуществлялось методом спектрального анализа [7], который позволяет получить распределение квадрата амплитуды колебаний по частотам. Продолжительность периода определяли по формуле:

$$T = \frac{2 * \Delta t * 100}{f},$$

где T – период ритмических изменений системы; Δt – временной интервал в часах; f – спектральная частота, соответствующая максимальному значению амплитуды колебаний.

Анализ циркадианнных ритмов проводился с использованием графически-

параметрического метода [4].

Результаты и их обсуждение

У интактных животных суточная динамика площади сечения капилляров характеризовалась циркадианным ритмом с периодом 25 ч, кроме того, методом спектрального анализа была выявлена и ультрадианная составляющая ритма с периодом 7,41 ч. Сглаженная кривая динамики площади сечения капилляров имела вид синусоиды (рис.2).

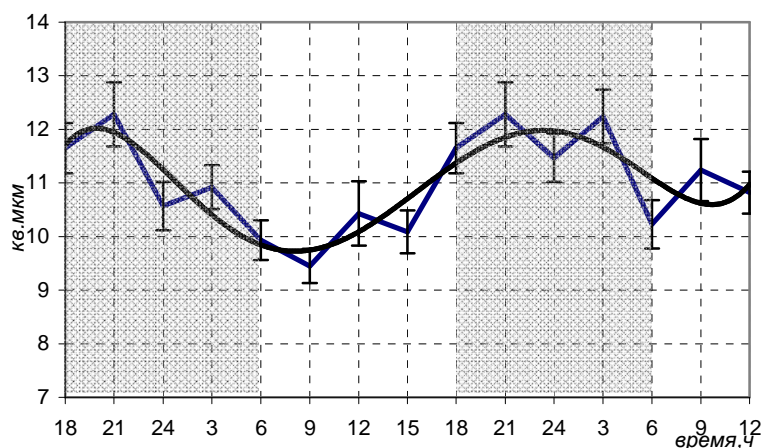


Рис. 2. Суточная динамика площади сечения капилляров семенников интактных животных (серым цветом выделены области темного времени суток)

Активная фаза циркадианного ритма приходилась на ночные часы как в первые (с 18 ч до 23 ч) сутки, так и во вторые сутки (с 17 ч до 5 ч) эксперимента. Акрофаза динамики площади сечения капилляров приходилась на 21 ч в первые сутки и во вторые сутки (табл. 1). Амплитуда колебаний площади капилляров за двухсуточный интервал времени составила $2,83 \text{ мкм}^2$. Минимальное значение площади капилляров наблюдалось в 9 ч в первые и в 6 ч во вторые сутки эксперимента.

Наличие циркадианного ритма динамики площади сечения капилляров говорит об изменении кровоснабжения семенника в течение суток, при этом максимальный суммарный просвет капилляров наблюдается в ночные часы, что коррелирует с активностью клеток Лейдига, которая максимальна также в темное время суток [6].

Таблица 1. Параметры циркадианного ритма площади сечения капилляров семенников контрольных и эпифизэктомированных животных

Параметр	Контроль		Эпифизэктомия	
	1 сутки	2 сутки	1 сутки	2 сутки
Мезор, мкм^2	$11,02 \pm 0,24$		$12,03 \pm 0,28$	
Акрофаза, ч	21-00	21-00	Ритм отсутствует	
Активная фаза, ч	18.00-23.00	17.00-5.00		
Длительность АФ, ч	5	12		

Абсолютная амплитуда, мкм^2	2,83	2,32
--------------------------------------	------	------

Механизм влияния эпифиза на просвет капилляров может быть обусловлен секрецией мелатонина, который по некоторым данным может регулировать тонус сосудов посредством взаимодействия с собственными рецепторами гладкомышечных клеток и эндотелиоцитов, вызывая их расслабление и, как следствие, увеличение просвета [8, 10].

Ультрадианный ритм динамики площади сечения капилляров, выявленный методом спектрального анализа, связан с изменением кровотока в капиллярах, и его наличие нельзя полностью отождествлять с прямым действием мелатонина на рецепторы. Его наличие – это возможный результат работы другого механизма нейрогуморальной регуляции тонуса кровеносных сосудов. Однако он также связан с секрецией эпифизом его инкретов, поскольку после эпифизэктомии период этого ритма изменяется, в данном случае, в сторону увеличения до 15,6 ч, следовательно, этот ритм имеет другое происхождение, но его период находится под синхронизирующим влиянием эпифиза. Чтобы понять его точную связь с эпифизом и функцию, необходимы дальнейшие исследования.

У эпифизэктомированных животных отсутствовал циркадианный ритм площади сечения капилляров. Спектральный анализ полученной динамики по виду приближается к прямой (рис. 3). Амплитуда колебаний площади капилляров за двухсуточный интервал времени составила $3,55 \text{ мкм}^2$, что было выше значений, полученных у интактных животных на 16,62 %. Минимальное значение площади капилляров наблюдалось в 18 ч в первые и в 24 ч во вторые сутки.

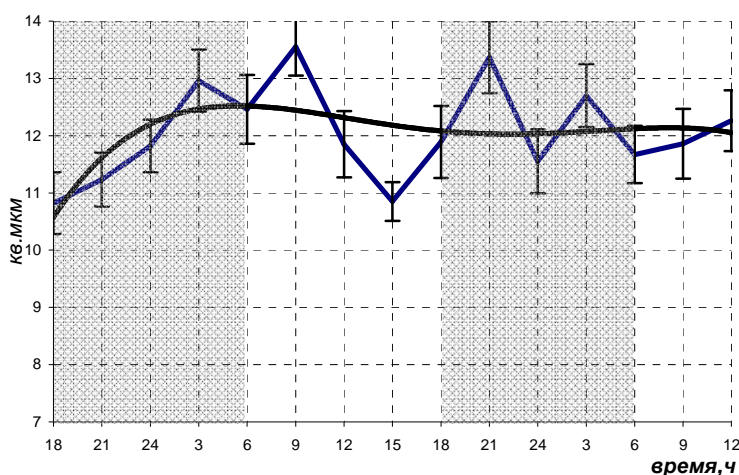


Рис. 3. Суточная динамика площади сечения капилляров семенников эпифизэктомированных белых крыс (серым цветом выделены области темного времени суток)

Таким образом, эпифизэктомия вызвала исчезновение циркадианного ритма и значительное увеличение периода ультрадианного ритма динамики площади сечения

капилляров микроциркуляторного русла семенников. Исчезновение циркадианного ритма доказывает участие эпифиза в регуляции просвета капилляров и подтверждает данные [8, 10] о наличии прямого мелатонинового рецепторного механизма регуляции тонуса капилляров микроциркуляторного русла.

Были найдены средние значения количества капилляров в 100 полях зрения в контрольной и опытной группе, которые достоверно различались. Количество капилляров в опытной группе оказалось выше, чем в контрольной ($p < 0,05$). Оно составило $15,8 \pm 1,38$ единиц в контрольной и $19,6 \pm 1,53$ единиц в опытной группах. Спектральный анализ массива данных, полученных при подсчете количества капилляров, не проводился, поскольку рост капилляров – это длительный процесс, занимающий по времени более суток, и на таком коротком временном интервале, относительно периода этого процесса, анализ разложением в ряд Фурье не даст достоверных результатов по динамике количества капилляров.

Обнаруженное увеличение количества капилляров может быть связано либо с увеличением просвета и включением в работу уже имеющихся, но функционально неактивных капилляров микроциркуляторного русла, либо с прорастанием новых капилляров в интерстициальной ткани. Эпифизэктомия привела к увеличению количества капилляров на 19,38 %. Неизвестно, каким путем удаление эпифиза привело к увеличению количества капилляров в интерстициальной ткани семенника крыс, но очевидно, что этот эффект связан с исчезновением инкретов эпифиза из кровотока. Возможно, если имел место рост капилляров, этот эффект связан с наличием цитостатических свойств у мелатонина и олигопептидов эпифиза [1]. Вопрос о конкретном механизме воздействия эпифизарных гормонов на количество капилляров требует дальнейшего исследования.

Заключение. Таким образом, емкость микроциркуляторного русла семенников характеризуется циркадианным ритмом, параметры которого коррелируют с ритмом активности эндокринной ткани семенников. Эпифизэктомия приводит не только к росту количества активных капилляров, но и к увеличению просвета функционирующих сосудов микроциркуляторного русла и утрате циркадианного ритма площади сечения капилляров. Отсутствие регуляторного влияния биологически активных веществ эпифиза приводит к рассогласованию кровенаполнения гонад и активности эндокринной ткани семенников.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.», гос.контракт №П1056 от 31.05.10.

Список литературы

1. Андреева Н. И., Аснина В. В., Либерман С. С. Мелатонин: фармакологические свойства и клиническое применение // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33. – № 8. – С. 44-52.

2. Арав В. И., Слесарев С. М., Слесарева Е. В. Метод экстирпации эпифиза у белых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – № 9. – С. 385-387.
3. Железняк Е. В. Исследование влияния биологически активных веществ эпифиза на регуляцию сперматогенеза: автореф. дис... канд. мед. наук / Железняк Е. В., Мордовск. гос. ун-т. им. Н. П. Огарёва. – Саранск, 2003. – 19с.
4. Романов Ю. А., Филиппович С. С., Кузин С. М. и др. Анализ временных параметров деления клеток при изменении фотопериодичности // Способы регенерации и клеточное деление. – М: Наука, 1979. – С. 44-56.
5. Слесарев С. М. Эпифизарная и тканевая регуляции временной организации пролиферации обновляющихся тканей: автореф. дис... доктора биол. наук. – М., 2009. – 47с.
6. Суточная структура морфофункциональной организации эндокринной ткани семенников при нарушении эпифизарной регуляции/ Е. В. Слесарева, В. И. Арав, Р. М. Хайруллин, С. М. Слесарев // Морфологические ведомости. – 2009. – №3-4. – С.96-98.
7. Чугасзян Г. Б. Ритмометрический подход к выявлению скрытой периодичности и описанию формы колебаний // Проблемы хронобиологии, хронопатологии, хронофармакологии и хрономедицины. – Уфа, 1985. – С. 51-52.
8. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2006. - Vol. 60. – № 3. – P. 97-108.
9. Garcia Bonacho M., Esquifino A.I., Castrillon P., Reyes Toso C., Cardinali, D.P. Agedependent effect of Freund's adjuvant on 24-hour rhythms in plasma prolactin, growth hormone, thyrotropin, insulin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rats // Life Sci. – 2000. – № 66. – P.1969-1977.
10. Pogan L., Bissonnette P., Parent L. The effects of melatonin on Ca (2+) homeostasis in endothelial cells // J. Pineal Res. – 2002. – Vol. 33. – № 1. – P. 37-47.

Сведения о рецензентах:

Ильина Наталья Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, проректор по науке ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И. Н. Ульянова», г. Ульяновск.

Перфильева Наталья Петровна, доктор биологических наук, профессор кафедры анатомии, физиологии и гигиены человека и ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И. Н. Ульянова», г. Ульяновск.