

УДК 611.814.53

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛЕСНОЙ ПОЛЁВКИ ПРИ УКОРОЧЕНИИ СВЕТЛОГО ВРЕМЕНИ СУТОК И ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ

Герасимов А.В., Костюченко В.П., Денисов А.А.

ГБОУВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2), e-mail: a_gerasimov@sibmail.com

С помощью методов световой и электронной микроскопии проведён количественный морфометрический анализ функционального состояния шишковидной железы двухмесячных самцов двух видов лесной полёвки весенне-летней и позднелетней генераций, рождённых в виварии от изъятых из природной среды самок и содержащихся при естественном освещении индивидуально и совместно с матерями. Сдвиги величины кариометрических и органомерических показателей, изменения ультраструктурной организации пинеалцитов при укорочении светлого времени суток и моделировании стресса на высокую плотность популяции свидетельствуют об участии шишковидной железы в реализации физиологических механизмов сдерживания полового созревания. Установлено, что в онтогенезе лесной полёвки шишковидная железа проявляет высокую активность, многообразие способов секреции и структурные преобразования, направленные на обеспечение функционирования в следующем году после рождения. У красной полёвки шишковидная железа более выражено реагирует на высокую плотность популяции. У красно-серой полёвки сдвиг функционального состояния шишковидной железы более выражен при укорочении светлого времени суток.

Ключевые слова: лесные полёвки, шишковидная железа, ультраструктура, укорочение суточной фотофазы, высокая плотность популяции.

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE PINEAL GLAND OF DIFFERENT SPECIES OF FOREST VOLE WITH THE SHORTENING OF THE DAYTIME AND HIGH DENSITY OF THE POPULATION

Gerasimov A.V., Kostyuchenko V.P., Denisov A.A.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia (634050, Tomsk, street Moskowski tract, 2), e-mail: a_gerasimov@sibmail.com

With the aid of the methods of light and electron microscopy is carried out the quantitative morphometric analysis of the functional state of the pineal gland of the two-month males of two species of the forest vole of the spring-summer and late-summer generations, originated in the vivarium from the females withdrawn from the natural medium and which were being contained with the natural illumination individually, also, together with the mothers. The shifts of the value of karyometric and organellometric indices, change in the ultrastructural organization of pinealocytes with the shortening of daytime and the simulation of stress to the high density of pineal gland into the realization of the physiological mechanisms of photo-dependent and the stress-dependent of the restraining of sexual ripening. It is established that in the ontogenesis of forest vole the pineal gland manifests high activity, variety of the methods of secretion and structural conversions, directed toward the guarantee of functioning in the following year after generation. In red-backed vole pineal gland more reacts to the high density of population. In grey red-backed vole the shift of the functional state of pineal gland is more expressed with the shortening of daytime.

Keywords: forest voles, pineal gland, ultrastructure, shortening of daytime, high density of population.

У лесной полёвки проявляется различная скорость полового созревания [9]. У вида красно-серая полёвка участие в размножении сеголеток позднелетней генерации определяется продолжительностью светлого времени суток, тогда как у красной полёвки – плотностью популяции. Высокая её плотность вызывает стресс. В реализации фотозависимых и опосредованных стрессом механизмов реализации программы онтогенеза принимает участие шишковидная железа [7]. Сдвиг морфометрических показателей

активности пинеальной секреции выявлен у двухмесячных неполовозрелых самцов красно-серой полёвки позднелетней генерации [2]. При моделировании стресса на высокую плотность популяции красно-серой полёвки также обнаружались морфологические признаки гиперфункции шишковидной железы [5]. Установлено, что у крыс кариометрические показатели активности интерстициальных эндокриноцитов яичек изменялись синхронно с пинеалоцитами шишковидной железы, гипоталамическими нейроэндокринными клетками супрахиазматических и паравентрикулярных ядер, регулирующими выработку гонадолиберина и опосредующими через ретино-гипоталамическую проекцию влияние света и стрессоров на шишковидную железу, гонадотропными эндокриноцитами гипофиза, чувствительными к гонадолиберину и пинеальному антигонадотропному гормону [4]. В качестве морфологических маркёров оценки активности шишковидной железы, кроме гистохимической реакции на мелатонин и кариометрических показателей пинеалоцитов, используют их органеллометрические показатели, изменения ультраструктурной организации ядер, ядрышек, эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи, лизосом, митохондрий, эндокринных везикул, синаптических лент, сфер, везикул с конкрециями [1, 3, 6, 8]. Каково функциональное состояние шишковидной железы, оказывающей влияние на выбор реализуемой программы онтогенеза у сеголеток разных видов лесной полёвки весенне-летней и позднелетней генераций при высокой плотности популяции, до настоящего времени остаётся не изученным.

Цель работы – оценить морфофункциональное состояние шишковидной железы у сеголеток-самцов красной полёвки и красно-серой в зависимости от продолжительности светлого времени суток и плотности популяции.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на двухмесячных сеголетках весенне-летней и позднелетней генераций в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1977). Детёныши-самцы, рождённые от изъятых из природной среды самок, содержались при естественном освещении и выводились из эксперимента в 10⁰⁰–11³⁰ ч путём декапитации. После отсепаровывания кожи, перерезки в области лобного шва, симметричного кругового вскрытия в направлении от лобной части к затылочной, отламывания костей свода черепа шишковидная железа отделялась от мозговых оболочек. На 2 ч выделенный материал погружался в смесь 4% параформальдегида и 2,5% глютаральдегида на 0,1М какодилатном буфере (pH 7,4, 4°C), в течение 2 ч постфиксировался в 1% OsO₄ на 0,1М какодилатном буфере (pH 7,4, 4°C), обезвоживался в этиловом спирте и заключался в смесь смол эпон–аралдит. Срезы изготавливались на ультратоме «Leica EM UC7» (Австрия). Полутонкие срезы, окрашенные азуром II, изучали в

микроскопе «Primo Star» («Carl Zeiss», Германия) с цифровой фотокамерой G-10 («Canon», Япония) и программным обеспечением «Axio Vision» («Carl Zeiss», Германия). В каждом срезе в 10-ти полях площадью 0,016 мм² измеряли ядра, ядрышки пинеалоцитов. Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали в трансмиссионном микроскопе «JEM-100 CX II» (JEOL, Япония). С помощью тест-системы, соответствующей 47 мкм² среза при увеличении ×25000, в 10-ти случайно отобранных пинеалоцитах измеряли удельный объём органелл. Данные морфометрии обрабатывали с помощью пакета программ «Statistica for Windows», версия 6.1 (StatSoft Inc., США). Для кариометрических показателей вычисляли среднее значение M , стандартное отклонение s , оценивали значимость различий по t -критерию Стьюдента. Для органеллометрических показателей вычисляли медиану Me , 25%-й и 75%-й квартили. Значимость различий оценивали по U -критерию Манна–Уитни на уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У лесной полёвки шишковидная железа имеет клеточный тип строения. Пинеалоциты условно подразделяются на светлые (тип I) и тёмные (тип II). Булавовидные отростки пинеалоцитов, транспортирующие секреторные везикулы, обнаруживаются в перикапиллярном пространстве. Капилляры с фенестрированным эндотелием. Вокруг капилляров и между клетками паренхимы выявляются «вакуоли» (рис. 1а).

Среди светлых пинеалоцитов выделяются клетки с комплексами гранулярной эндоплазматической сети (тип Ia) и развитым комплексом Гольджи (тип Ib). Для Ib-клеток характерна нейрокринная секреция. В пинеалоцитах типа Ia находят место нейрокринная и эпэндимоподобная секреция.

У совместно содержащихся сеголеток красной полёвки среди Ib-пинеалоцитов обнаруживаются гипертрофированные клетки. Гипертрофию и гиперплазию претерпевают митохондрии и комплекс Гольджи в их цитоплазме. С активизацией нейросекреции пинеальных гормонов, возможно, антигонадотропного пептида и мелатонина, по-видимому, связано сдерживание полового созревания. Образуются поля синаптических сфер, что также свидетельствует об активизации деятельности железы. В Ia-клетках вокруг крупных комплексов цистерн гранулярной эндоплазматической сети выявляются секреторные везикулы и многочисленные митохондрии. Митохондриальные кристы широкие, матрикс умеренно электронно-плотный (рис. 1б).

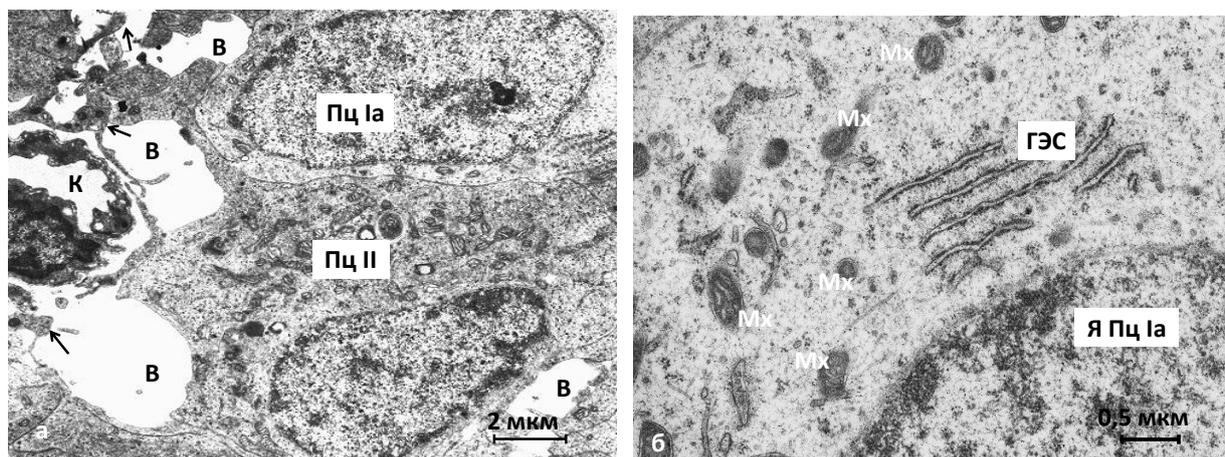


Рис. 1. Ультраструктура шишковидной железы красной полёвки: а – позднелетняя генерация, индивидуальное содержание, б – весенне-летняя генерация, совместное содержание. В – «вакуоли», К – капилляр, Пц – пинеалоциты типа Ia и II, стрелки – булабовидные отростки, ГЭС – гранулярная эндоплазматическая сеть, Мх – митохондрии, Я – ядро. Электронограммы

При совместном содержании ядра Ib-пинеалоцитов у красной полёвки увеличивается на 7,5%, на 27% – удельный объём гранулярной эндоплазматической сети, на 41% – комплекса Гольджи, на 49% – митохондрий. Диаметр ядрышек уменьшается на 5,2%. У красно-серой полёвки сдвиги показателей менее выражены: удельный объём гранулярной эндоплазматической сети уменьшается на 19%, митохондрий – увеличивается на 21% (табл. 1).

Таблица 1

Различия при перенаселении кариометрических показателей ($M \pm s$) и органеллометрических ($Me (Q_1-Q_3)$, $p < 0,05$) пинеалоцитов типа Ib у лесной полёвки

Вид	красная полёвка		красно-серая полёвка	
	совместное (n=6)	индивидуальное (n=4)	совместное (n=5)	индивидуальное (n=3)
S _я , мкм ²	57,4±11,1* p<0,001	53,4±5,4	53,4±11,6	54,4±12,3
d _{як} , мкм	1,46±0,23* p<0,001	1,54±0,15	1,51±0,20	1,56±0,15
V _{ГЭС} , %	3,39* (3,14–3,81)	2,67 (2,08–3,56)	1,57* (1,23–2,10)	1,94 (1,36–2,84)
V _{Мх} , %	8,23* (7,48–8,62)	5,52 (5,21–6,56)	7,66* (7,31–7,90)	6,33 (6,02–7,23)
V _{КГ} , %	4,44* (4,17–4,72)	3,14 (2,94–3,59)	3,08 (2,31–3,88)	3,47 (3,32–3,66)

Примечание: * – значимые различия в пределах вида, S_я – площадь ядра, d_{як} – диаметр ядрышка, V_{ГЭС} – удельный объём гранулярной эндоплазматической сети в цитоплазме, V_{Мх} – митохондрий, V_{КГ} – комплекса Гольджи.

Не исключено, что склонные к эпендимоподобной секреции пинеалоциты с комплексами параллельных цистерн гранулярной эндоплазматической сети являются «добавочными», включаются в гормонпродуцирующую деятельность при стрессе, усиливая нейрокринный эффект «главных» светлых пинеалоцитов со стопками Гольджи.

При совместном содержании у красной полёвки разрастается астроглия, уменьшается число пинеалоцитов, чаще обнаруживаются тёмные, дегенерирующие и гипертрофированные светлые пинеалоциты, а также гигантские межклеточные «вакуоли» с конкрециями. У красно-серой полёвки клеточная гипертрофия не выражена. «Вакуоли» мелкие. Тёмных пинеалоцитов больше в поверхностной зоне органа, чем в глубокой, где выявляются очаги атрофии паренхимы (рис. 2).

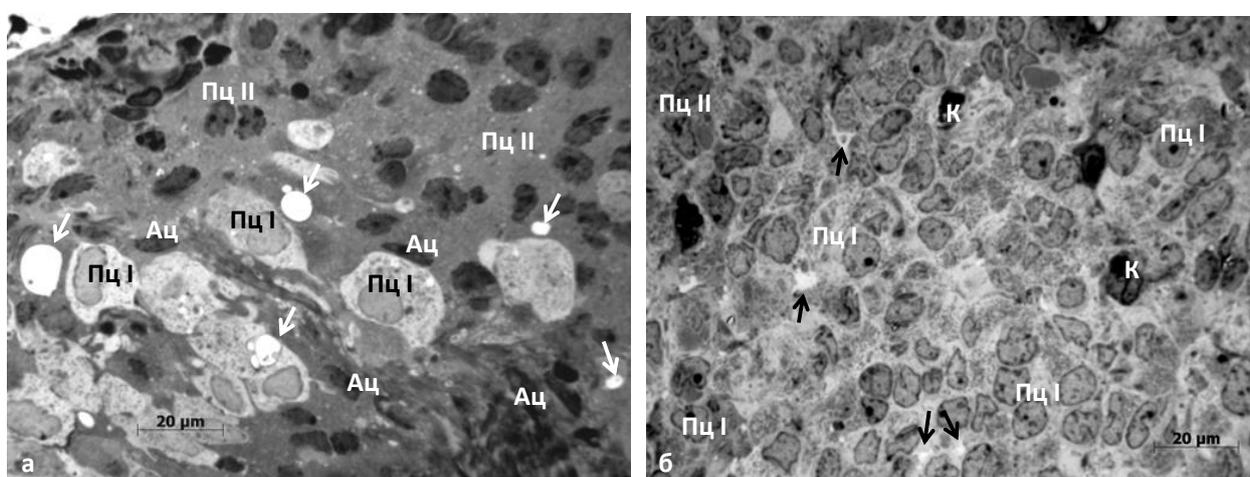


Рис. 2. Шишковидная железа сеголеток позднелетней генерации совместного содержания: а – красная полёвка, поверхностная зона, б – красно-серая полёвка, глубокая зона. Ац – астроциты, К – капилляр, Пц – пинеалоциты типа I и II. Стрелки – межклеточные «вакуоли» с песчинками. Окраска азуром II

Увеличение у красной полёвки числа несекретирующих тёмных пинеалоцитов, гипертрофия светлых свидетельствуют о том, что, в железе, наряду с «подготовкой» к переходу в состояние зимнего «покоя», проявляется активная гормонпродуцирующая деятельность. Утилизация и замещение астроцитами апоптотически гибнущих дегенерирующих пинеалоцитов, возможно, являются отражением подавления другой онтогенетической программы, связанной с быстрым ростом и половым созреванием [9]. Клеточная гипертрофия, формирование гигантских «вакуолей» в местах гибели пинеалоцитов и массового залегания тёмных клеток с небольшими зазубренными ядрами может рассматриваться как проявление приспособительной реакции на стресс. Красную полёвку можно охарактеризовать как вид со стрессорным типом функциональной организации шишковидной железы.

Единичные межклеточные «вакуоли» с конкрециями, наличие пинеалоцитов с узкими перикарионами, бедными органеллами, и небольшими причудливой формы ядрами, очагов атрофии у красно-серой полёвки свидетельствуют о слабой вовлечённости шишковидной железы данного вида в реакцию на стресс. Очевидно, эффект влияния света на циркадианные пейсмекеры у красно-серой полёвки превалирует над экстремальным воздействием высокой плотности популяции. Гипоталамо-гипофизарная, симпатико-адреналовая и половая системы не проявляют такой активности как у красной полёвки. Участие в размножении сеголеток позднелетней генерации у красно-серой полёвки определяется не столько плотностью популяции, как укорочением суточной фотофазы.

У сеголеток красно-серой полёвки позднелетней генерации индивидуального содержания по сравнению с весенне-летней обнаруживается большее число «вакуолей» (рис. 3).

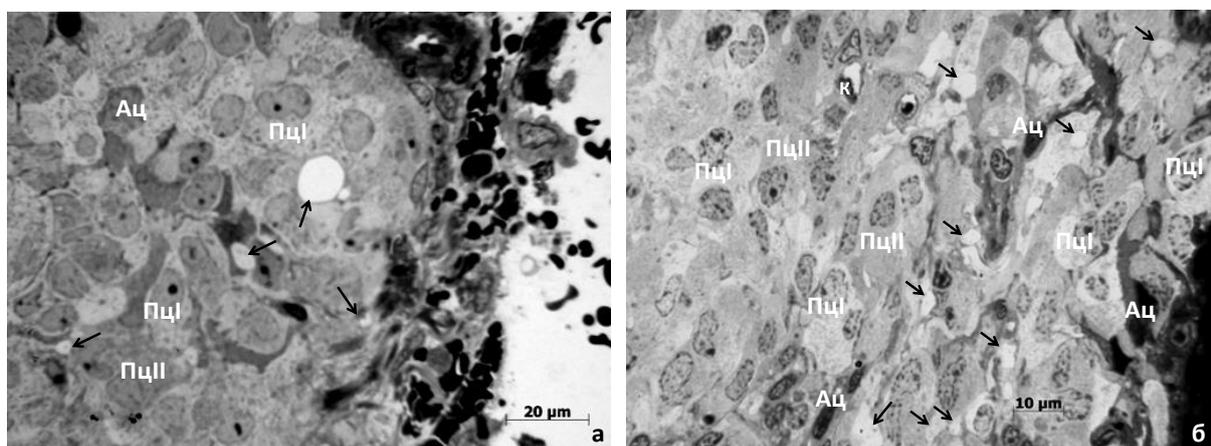


Рис. 3. Участок поверхностной зоны шишковидной железы сеголеток красно-серой полёвки, содержащихся индивидуально: а – весенне-летняя генерация, б – позднелетняя генерация.

Ац – астроциты, стрелки – межклеточные «вакуоли», К – капилляр, Пц – пинеалоциты типа I и II. Окраска азуром II

Карио- и органеллометрические показатели функциональной активности пинеалоцитов у сеголеток лесной полёвки проявляют межвидовой сдвиг с укорочением светлого времени суток. Так, ядра светлых клеток типа Ib красно-серой полёвки весенне-летней генерации на 18%, диаметр ядрышек на 7% больше красной. Удельный объём гранулярной эндоплазматической сети в цитоплазме в 2,4 раза уступает красной. При более короткой суточной фотофазе ядра светлых пинеалоцитов красно-серой полёвки на 28% превосходят площадь их среза у красной полёвки, диаметр ядрышек – на 12%, удельный объём комплекса Гольджи – на 23% больше, гранулярной эндоплазматической сети – в 1,9 раза меньше красной полёвки. Более выраженный сдвиг показателей, отражающих

функциональную активность шишковидной железы красно-серой полёвки, возможно, предопределяет задержку их полового созревания, что не всегда проявляется у красной полёвки (табл. 2).

Таблица 2

Кариометрические ($M \pm s$) и органеллометрические ($Me (Q_1-Q_3)$, $p < 0,05$) показатели пинеалоцитов типа Ib у лесной полёвки

Генерация	весенне-летняя		позднелетняя	
	красная полёвка (n=6)	красно-серая полёвка (n=4)	красная полёвка (n=4)	красно-серая полёвка (n=4)
$S_{Я}$, мкм ²	54,9±8,3	64,8±7,0* p<0,001	41,9±10,0	53,7±11,8* p<0,001
$d_{Як}$, мкм	1,51±0,19	1,61±0,17* p<0,001	1,36±0,21	1,52±0,19* p<0,001
$V_{ГЭС}$, %	3,32 (2,89–3,66)	1,36* (0,96–2,40)	3,12 (2,70–3,26)	1,63* (1,32–2,40)
$V_{Мх}$, %	7,32 (6,42–8,39)	7,46 (6,92–7,84)	7,18 (6,63–7,59)	7,26 (6,33–7,66)
$V_{КГ}$, %	4,05 (3,41–4,56)	3,93 (3,12–4,72)	2,82 (2,08–3,94)	3,47* (2,80–3,72)

Примечание: * – значимые различия с красной полёвкой в пределах генерации.

Заключение

Таким образом, на основании проведённого анализа изменений морфофункционального состояния шишковидной железы у двухмесячных самцов-сеголеток двух видов лесной полёвки весенне-летней и позднелетней генераций индивидуального и совместного содержания можно объяснить видовые особенности реализации программы онтогенеза. Программа сдерживания полового созревания у красно-серой полёвки реализуется, благодаря фотозависимому характеру морфофункциональной организации шишковидной железы, на секреторную активность которой выраженное воздействие оказывает продолжительность светлого времени суток. Красная полёвка имеет стрессорный тип функциональной организации шишковидной железы, в большей мере реагирующий не на изменения продолжительности светлого времени суток, а на высокую плотность популяции.

Список литературы

1. Герасимов А.В., Радченко Д.В. Способ гистохимического выявления мелатонина // Патент РФ № 2099706, 20.12.1997.
2. Герасимов А.В. Морфология шишковидной железы мышей с задержкой полового созревания / А.В. Герасимов, С.В. Логвинов, В.П. Костюченко, Л.Б. Кравченко // Бюл.

сибирской медицины. – 2012. – Т. 10, № 4. – С. 22–25.

3. Герасимов А.В. Ультраструктурные особенности пинеалоцитов шишковидной железы грызунов в возрастном аспекте / А.В. Герасимов, В.П. Костюченко, С.В. Логвинов, А.В. Потапов, Е.Ю. Варакута // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 12 (3). – С. 449–452.

4. Герасимов А.В. Морфологические маркёры лунафазных изменений органов у крыс / А.В. Герасимов, В.П. Костюченко, Д.К. Гармаева, С.А. Фёдорова // *Якутский мед. журн.* – 2014. – № 1. – С. 13–16.

5. Герасимов А.В. Ультраструктурные особенности пинеалоцитов с признаками секреторной активности у крыс и полёвок при стрессе / А.В. Герасимов, В.П. Костюченко, Л.Б. Кравченко, С.В. Логвинов, А.В. Потапов, Е.Ю. Варакута, Е.Ю. Аникина // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10 (5). – С. 873–877.

6. Герасимов А.В. Шишковидная железа как эндокринно-гравитационный лунасенсор: обнаружение лунафазных морфологических изменений у мышей / А.В. Герасимов, В.П. Костюченко, А.С. Соловьёва, А.М. Оловников // *Биохимия*. – 2014. – Т. 79, вып. 10. – С. 1316–1323.

7. Логвинов С.В., Герасимов А.В. Циркадианная система и адаптация. Морфофункциональные и радиобиологические аспекты. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. – 200 с.

8. Karasek M. Effects of superior cervical gangliectomy on the ultrastructure of pinealocytes in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): quantitative study / M. Karasek, A. Zielinska, K. Marek, J. Swieto-slowski // *Neuro Endocrinol. Lett.* – 2002. – Vol. 23, № 5–6. – P. 443–446.

9. Novikov E., Moshkin M. Sexual maturation, adrenocortical function and population density of red-backed vole, *Clethrionomys rutilus* (Pall) // *Mammalia*. – 1999. – Vol. 62, № 4. – P. 520–540.

Рецензенты:

Пурлик И.Л., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск;

Мустафина Л.Р., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск.