

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ТРЕХНЕДЕЛЬНЫХ САМЦОВ ЛЕСНОЙ ПОЛЕВКИ

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 проведен количественный морфометрический анализ функционального состояния шишковидной железы трехнедельных самцов трех видов лесной полевки, рожденных в виварии от изъятых из природной среды самок и содержащихся при естественном освещении. Выявлены морфологические признаки секреторной активности шишковидной железы, различные способы секреции, типы пинеалоцитов, различающиеся по ультраструктуре и механизму секреции пинеальных гормонов, видовые особенности строения, функционирования шишковидной железы, сдерживающей половое созревание, кариометрических и органеллометрических показателей секреторной активности пинеалоцитов. По критериям морфологического анализа произведена оценка степени зрелости пинеалоцитов. Установлено, что у самцов лесной полевки в трехнедельном возрасте шишковидная железа может состоять преимущественно из юных пинеалоцитов и единичных гормонпродуцирующих клеток, пинеалоцитов с комплексами цистерн гранулярной эндоплазматической сети, пинеалоцитов со стопками Гольджи и одиночными цистернами гранулярной эндоплазматической сети.

Ключевые слова: трехнедельные самцы, лесная полевка, шишковидная железа, ультраструктура

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE PINEAL GLAND OF THE THREE-WEEK MALES OF THE FOREST VOLE

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

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

The quantitative morphometric analysis of the functional state of the pineal gland of the three-week males of three species of forest vole, originated in the vivarium from the females withdrawn from the natural medium and which were being contained with the natural illumination, is carried out with the aid of the methods of light and electron microscopy. Are revealed the morphological signs of the secretory activity of pineal gland, the different methods of secretion, the types of pinealocytes, which are distinguished by ultrastructure and mechanism of the secretion of pineal hormones, the specific special features of structure, functioning of the pineal gland, which restrains sexual ripening, the karyometric and organellometric indices of the secretory activity of pinealocytes. On the criteria of morphological analysis is made a evaluation of the degree of the maturity of pinealocytes. It is established that in the males of forest vole at the three-week age the pineal gland can consist predominantly of young pinealocytes and single hormone producing cells, pinealocytes with the complexes of the cisterns of rough endoplasmic reticulum, pinealocytes with the Golgi stack and the single cisterns of rough endoplasmic reticulum.

Keywords: three-week males, forest vole, pineal gland, ultrastructure

Лесная полевка относится к хомяковым мышеобразным грызунам, у которых проявляется быстрое и отсроченное на следующий год после рождения половое созревание. Известно, что на скорость полового созревания оказывают влияние пинеальные гормоны [6]. В качестве морфологических маркеров секреторной активности шишковидной железы рассматривают кариометрические и органеллометрические показатели пинеалоцитов, ранее называемых светлыми (тип I), изменения ультраструктурной организации их ядер, ядрышек, эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи, лизосом, митохондрий, эндокринных везикул, синаптических лент, сфер, везикул с конкрециями, эпендимоподобная и

нейросекреция [1, 3, 4, 5]. Ранее нами по критериям кариометрического и органомерического анализа пинеалцитов было установлено, что у двухмесячных самцов позднелетней генерации красно-серой полевки, в отличие от красной полевки, на фоне естественного укорочения суточной фотофазы наблюдается усиление секреторной активности шишковидной железы, сдерживающей половое созревание [2]. Морфологические признаки гиперфункции шишковидной железы у красно-серой полевки проявлялись при моделировании стресса на высокую плотность популяции [4]. У трехнедельных и двухмесячных самцов красно-серой полевки с задержкой полового созревания в шишковидной железе обнаружены юные пинеалциты, не характерные для половозрелых особей [3].

Каково морфофункциональное состояние шишковидной железы у трехнедельных детенышей-самцов лесной полевки разных видов, каковы особенности структурной организации железы и механизмы секреции пинеальных гормонов, до настоящего времени остается неизученным.

Цель работы – оценить морфофункциональное состояние шишковидной железы у трехнедельных сеголеток-самцов разных видов лесной полевки.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на трехнедельных сеголетках трех видов лесной полевки ($n=8$) в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1977). Детеныши-самцы, рожденные от изъятых из природной среды самок, содержались при естественном освещении и выводились из эксперимента в 10⁰⁰–11³⁰ ч путем 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 полях площадью 0,016 мм² измеряли ядра, ядрышки пинеалцитов. 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 $\times 25000$, в 10 случайно отобранных

пинеалоцитах измеряли удельный объем 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 трехнедельных самцов весенне-летней и позднелетней генераций разных видов лесной полевки шишковидная железа не разделена на дольки соединительно-тканными перегородками. В паренхиме численно преобладают пинеалоциты. Астроцитов на порядок меньше. Капилляры с фенестрированным эндотелием, облегчающим проникновение гормонов в кровь, и сплошной базальной мембраной. В перикапиллярном пространстве располагаются тонкие пучки коллагеновых волокон, отростки астроцитов, булавовидные окончания отростков пинеалоцитов, нервные волокна, нейро-железистые окончания, преимущественно адренергические с гранулярными синаптическими пузырьками (рис. 1).

В месте залегания нейро-железистых окончаний в цитоплазме пинеалоцитов выявляются синаптические ленты и сферы с плотной сердцевиной, окруженной мелкими светлыми синаптическими пузырьками диаметром 50 нм, что по данным литературы [7] свидетельствует о «функциональной зрелости» гормонпродуцирующих клеток. Кроме того, в цитоплазме пинеалоцитов, бедной органеллами мембранного строения, обнаруживаются скопления полисом, пучки микротрубочек. Крупные митохондрии имеют широкие продольно и поперечно ориентированные кристы и частично просветленный матрикс (рис. 2).

Юные пинеалоциты имеют узкие перикарионы, бедные органеллами. Оболочка их ядер не образует заметных складок. В пинеалоцитах, дифференцирующихся в светлые клетки типа Ia, гранулярная часть ядрышек и наружная ядерная мембрана используются для построения комплексов гранулярной эндоплазматической сети, комплекс Гольджи редуцируется и состоит из мелких диктиосом (рис. 3).

В пинеалоцитах, дифференцирующихся в светлые клетки типа Ib, выявляются крупные стопки Гольджи, одиночные цистерны гранулярной эндоплазматической сети и гранулярные секреторные везикулы диаметром 150 нм. Возможно, что гранулярные эндокринные везикулы транспортируют из комплекса Гольджи антигонадотропный пептид и белок, связывающий мелатонин [7] (рис. 4).

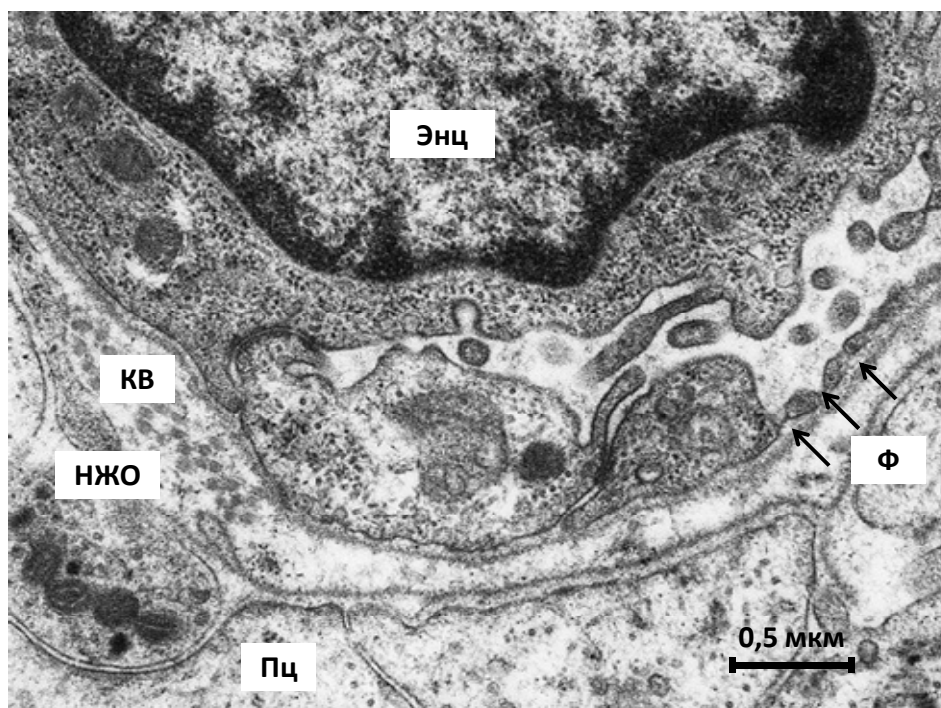


Рис. 1. Фрагмент шишковидной железы красной полевки. КВ – коллагеновые волокна, НЖО – нейро-железистое окончание с гранулярными синаптическими пузырьками, Пц – участок цитоплазмы светлого пинеалоцита, Ф – фенестры, Энц – эндотелиоцит капилляра, ограниченного сплошной базальной мембраной. Электронограмма

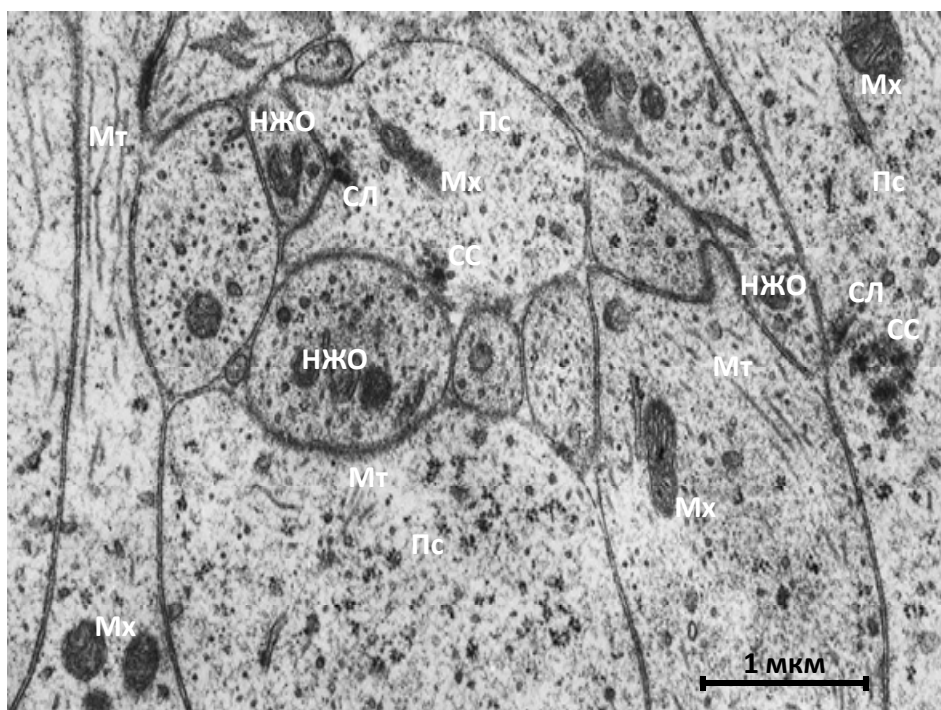


Рис. 2. Фрагмент шишковидной железы рыжей полевки. НЖО – нейро-железистые окончания, Мт – микротрубочки в цитоплазме пинеалоцитов, Мх – митохондрии, Пс – полисомы, СЛ – синаптические ленты, СС – синаптические сферы. Электронограмма

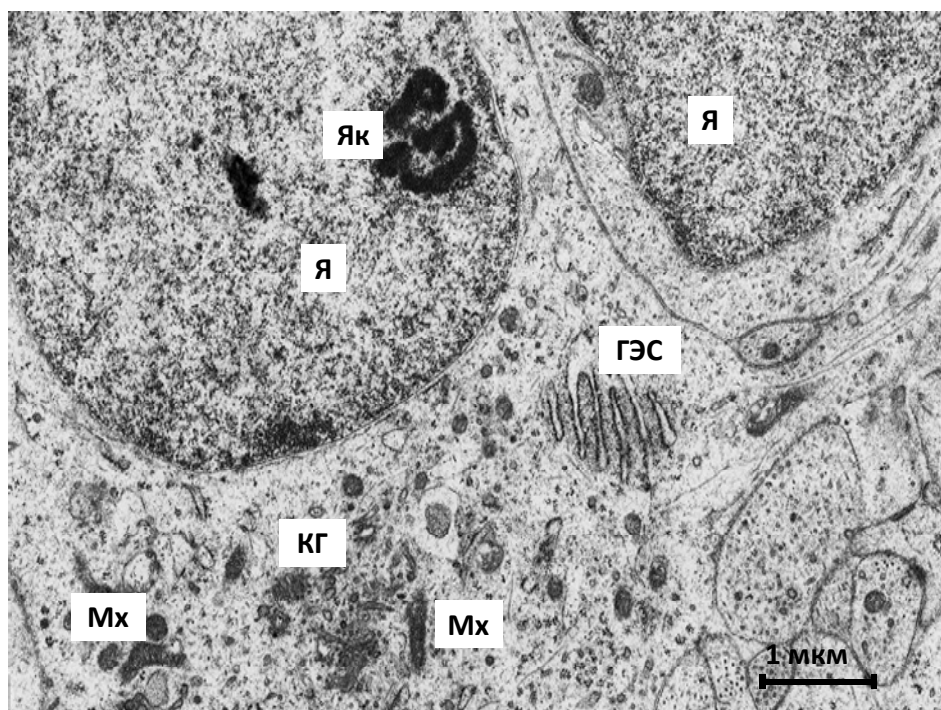


Рис. 3. Юный светлый пинеалоцит с узким перикарионом, бедным органеллами, и пинеалоцит, дифференцирующийся в клетку типа Ia рыжей полевки: ГЭС – формирующийся комплекс из параллельных цистерн гранулярной эндоплазматической сети, КГ – комплекс Гольджи, состоящий из мелких диктиосом, Мх – митохондрии, Я – ядра, Як – ретикулярное ядрышко в ядре дифференцирующейся клетки. Электронограмма

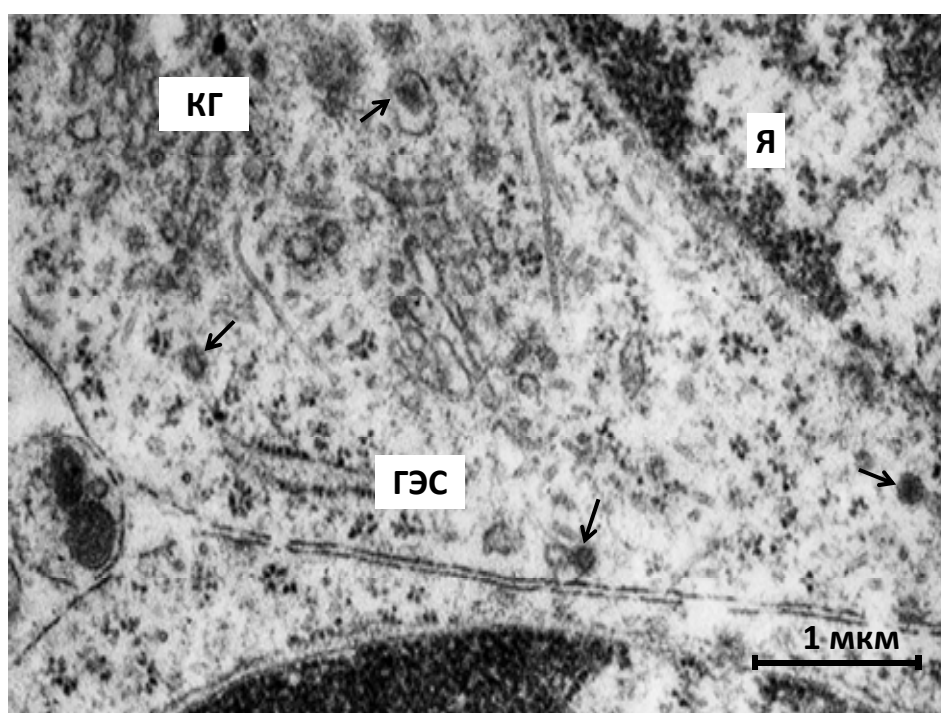


Рис. 4. Часть светлого пинеалоцита типа Ib красно-серой полевки: ГЭС – цистерна гранулярной эндоплазматической сети, КГ – развитый комплекс Гольджи, Я – ядро,

стрелки – секреторные везикулы с плотной сердцевиной и светлым ореолом.

Электронограмма

Темные пинеалocyтy типа II, не содержащие секреторных везикул, синаптических сфер и лент, могут рассматриваться как несекретирующие [7]. Светлые пинеалocyтy типа Ib проявляют признаки нейрокринной секреции, типа Ia – эпeндимоподобной и нейрокринной секреции, в них также обнаруживаются везикулы, производные комплекса Гольджи, с «песчинками», смещение которых, возможно, оказывает влияние на функционирование синаптических лент, сфер, секрецию пинеальных гормонов [3, 4, 5].

При сравнении кариометрических и органеллометрических показателей секреторной активности пинеалocyтoв типа Ib у трехнедельных самцов разных видов лесной полевки обнаруживается, что наиболее крупные ядрышки и высокая плотность органелл в цитоплазме отмечаются у красно-серой полевки. Возможно, это связано с более продвинутой дифференцировкой небольшой части юных пинеалocyтoв в зрелые выделяющиеся эндокринные клетки. Пролиферация юных пинеалocyтoв обеспечивает разрастание паренхимы железы и подготавливает ее к массивной секреции пинеальных гормонов, сдерживающих половое созревание [2, 6]. Умеренно развитая гранулярная эндоплазматическая сеть и митохондрии, слабо развитый комплекс Гольджи у красной полевки и, наоборот, умеренно развитый комплекс Гольджи и слабо развитая гранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии у рыжей полевки, возможно, обусловлены менее продвинутой, чем у красно-серой полевки, дифференцировкой пинеалocyтoв. У красной полевки, по-видимому, менее выражена нейрокринная секреция, у рыжей – более выражено разделение пинеалocyтoв на Ia и Ib, поэтому в клетках Ib наименее развиты гранулярная эндоплазматическая сеть и митохондрии (таблица).

Таблица

Межвидовые различия кариометрических показателей ($M \pm s$) и органеллометрических ($Me (Q_1-Q_3)$, $p < 0,05$) пинеалocyтoв типа Ib у трехнедельных сеголеток лесной полевки

Вид	красная полевка (n=2)	красно-серая полевка (n=3)	рыжая полевка (n=3)
$S_{я}, \text{мкм}^2$	$55,0 \pm 6,1$ $p < 0,001^{KC P}$	$48,1 \pm 3,0$ $p < 0,001^{K P}$	$58,9 \pm 4,0$ $p < 0,001^{K KC}$
$d_{як}, \text{мкм}$	$1,40 \pm 0,09$ $p < 0,001^{KC}$	$1,70 \pm 0,44$ $p < 0,001^{K P}$	$1,40 \pm 0,07$ $p < 0,001^{KC}$
$V_{ГЭС}, \%$	$4,04^{KC P}$ (3,96–4,10)	$4,63^{K P}$ (4,55–4,83)	$3,37^{K KC}$ (3,26–3,42)
$V_{Мх}, \%$	$5,42^{KC P}$ (5,34–5,54)	$9,18^{K P}$ (8,75–9,34)	$4,52^{K KC}$ (4,38–4,58)
$V_{КГ}, \%$	$1,70^{KC P}$ (1,64–1,78)	$5,19^{K P}$ (4,92–5,32)	$1,98^{K KC}$ (1,92–2,04)

Примечание. К – значимые различия с красной полевкой, КС – красно-серой, Р – рыжей, $S_{я}$ – площадь ядра, $d_{як}$ – диаметр ядрышка, $V_{ГЭС}$ – удельный объем гранулярной эндоплазматической сети в цитоплазме, $V_{Мх}$ – митохондрий, $V_{КГ}$ – комплекса Гольджи.

Заключение

Таким образом, шишковидная железа трехнедельных сеголеток-самцов трех видов лесной полевки – красной, красно-серой и рыжей — проявляет морфологические признаки функциональной активности, эпэндимоподобную и нейрокринную секрецию. В шишковидной железе наряду с юными пинеалоцитами выделяются два типа дифференцированных пинеалоцитов (тип I – светлые, тип II – темные), два подтипа гормонпродуцирующих светлых клеток (Ia и Ib). Пинеалоциты типа Ib имеют стопки Гольджи и одиночные цистерны гранулярной эндоплазматической сети. Пинеалоциты типа Ia содержат комплексы из параллельных цистерн гранулярной эндоплазматической сети и слабо развитый комплекс Гольджи. Нейрокринная секреция проявляется менее широко у красной полевки, разделение светлых пинеалоцитов на подтипы – у рыжей полевки. Красно-серая полевка наряду с юными пинеалоцитами, обеспечивающими разрастание паренхимы органа, имеет наиболее продвинутые в дифференцировке клетки, вырабатывающие пинеальные гормоны, сдерживающие половое созревание.

Список литературы

1. Герасимов А.В., Логвинов С.В., Костюченко В.П. Морфологические изменения в эпифизе у крыс при длительном освещении ярким светом // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 7. – С. 97–99.
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. Ультраструктурные особенности пинеалоцитов с признаками секреторной активности у крыс и полевок 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.
5. Герасимов А.В. Шишковидная железа как эндокринно-гравитационный лунасенсор: обнаружение лунафазных морфологических изменений у мышей / А.В. Герасимов, В.П.

Костюченко, А.С. Соловьева, А.М. Оловников // Биохимия. – 2014. – Т. 79, вып. 10. – С. 1316–1323.

6. Barrett P., Bolborea M. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin // J. Pineal Res. – 2012. – Vol. 52. – P. 376–388.

7. Karasek M., Reiter R. Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland // Microsc. Res. Tech. – 1992. – Vol. 21. – P. 136–157.

Рецензенты:

Плешко Р.И., д.м.н., профессор, профессор кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск;

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