

УДК 611.814.53

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РЫЖЕЙ ПОЛЁВКИ ПРИ УКОРОЧЕНИИ СУТОЧНОЙ ФОТОФАЗЫ И ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ

Герасимов А.В., Костюченко В.П., Логвинов С.В., Денисов А.А., Потапов А.В., Варакута Е.Ю.

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 рыжей полёвки весенне-летней и позднелетней генераций, рождённых в виварии от изъятых из природной среды самок и содержавшихся при естественном освещении индивидуально и совместно с матерями. Сдвиги величины кариометрических и органеллометрических показателей, изменения ультраструктурной организации пинеалоцитов при укорочении светлого времени суток и моделировании стресса на высокую плотность популяции свидетельствуют об участии шишковидной железы в реализации физиологических механизмов фотозависимого и стресс-зависимого сдерживания полового созревания. По критериям морфологического анализа произведена оценка комбинированного действия укорочения суточной фотофазы и высокой плотности популяции на секреторную активность пинеалоцитов. Установлено, что в онтогенезе рыжей полёвки шишковидная железа проявляет высокую активность, многообразие способов секреции и структурные преобразования, направленные на обеспечение функционирования в следующем году после рождения.

Ключевые слова: рыжая полёвка, шишковидная железа, ультраструктура, укорочение суточной фотофазы, высокая плотность популяции.

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE PINEAL GLAND OF BANK VOLE WITH THE SHORTENING OF DAILY PHOTOPHASE AND HIGH DENSITY OF POPULATION

Gerasimov A.V., Kostyuchenko V.P., Logvinov S.V., Denisov A.A., Potapov A.V., Varakuta E.Y.

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males of the bank vole of the spring-summer and late-summer generations, originated in the vivarium from the females withdrawn from the natural medium and which were being contained with the natural illumination individually, also, together with the mothers.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 population testify about the participation of pineal gland into the realization of the physiological mechanisms of photo-dependent and the stress-dependent of the restraining of sexual ripening. On the criteria of morphological analysis is made a evaluation of the combined action of the shortening of daily photophase and high density of population on the secretory activity of pinealocytes. It is established that in the ontogenesis of bank 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.

Keywords: bank vole, pineal gland, ultrastructure, shortening of daytime, high density of population.

У рыжей полёвки проявляются два варианта онтогенеза: с быстрым ростом, половым созреванием и бифазным ростом, половым созреванием на следующий год после рождения. Торможение полового созревания при отсутствии возможности расселения сеголеток позднелетней генерации позволяет направить ресурсы организма на переживание неблагоприятных условий и реализацию репродуктивного потенциала на следующий год

после рождения [7]. Известно, что гормон шишковидной железы – мелатонин является хронобиотиком, оказывающим влияние на многие физиологические процессы, в том числе на репродукцию [9]. Через 48 ч круглосуточного освещения крыс мелатонин в шишковидной железе не выявляется, но, благодаря высокой пластичности пинеалоцитов, она адаптируется к 3-месячному освещению крыс ярким светом [1, 8]. О сдвигах функционального состояния органа у различных видов грызунов свидетельствуют кариометрические и органеллометрические показатели пинеалоцитов, ультраструктура их ядра, ядрышек, гранулярной эндоплазматической сети, комплекса Гольджи, лизосом, митохондрий, эндокринных везикул, синаптических лент, сфер, телец и везикул с конкрециями [4, 5, 6]. Установлено, что у крыс кариометрические показатели пинеалоцитов изменяются синхронно с гипоталамическими нейроэндокринными клетками супрахиазматических и паравентрикулярных ядер, проецирующими влияние света в шишковидную железу, гонадотропными эндокриноцитами гипофиза, чувствительными к гонадолиберину и пинеальному антигонадотропному пептиду, интерстициальными эндокриноцитами яичек, вырабатывающими тестостерон, стимулирующий сперматогенез [2]. Супрахиазматические ядра – фотозависимые пейсмекеры, регулирующие секрецию гонадолиберина, опосредующие через паравентрикулярные ядра влияние стрессоров на шишковидную железу, стимулирующие выработку пинеальных гормонов, адренокортикотропного гормона в гипофизе, кортикостероидов в надпочечниках. Обратное влияние периферического звена эндокринной системы на центральное звено индуцирует угнетение продукции гонадолиберина, гонадотропного гормона и тестостерона [8]. У самцов красно-серой полёвки позднелетней генерации сдвиги величины кариометрических и органеллометрических показателей пинеалоцитов свидетельствуют об активизации гормонпродуцирующей деятельности шишковидной железы, сдерживающей половое созревание [3]. Её гиперфункция проявляется у красно-серой полёвки при моделировании стресса на высокую плотность популяции, у крысы – на круглосуточное освещение [5]. Каково функциональное состояние шишковидной железы при укорочении суточной фотофазы и высокой плотности популяции рыжей полёвки, до настоящего времени остаётся не изученным.

Цель работы – оценить морфофункциональное состояние шишковидной железы рыжей полёвки с учётом продолжительности светлого времени суток и численности при клеточном содержании в виварии.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на 13-ти 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 10^{00} - 11^{30} 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), обезжизивался 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 рыжей полёвки шишковидная железа имеет клеточный тип строения. Пинеалоциты типа I (ранее называли светлыми) располагаются небольшими группами и одиночно среди пинеалоцитов типа II (ранее называли тёмными). Перикарионы и отростки пинеалоцитов тесно прилегают друг к другу, слабо, с разной степенью выраженности окрашиваются азуром II. Между пинеалоцитами и в перикапиллярном пространстве обнаруживаются псевдовакуоли с конкрециями. Ядра пинеалоцитов вытянуты в различных направлениях, имеют 1–2 ядрышка, мелкодисперсный хроматин, складчатую оболочку. Митохондрии придают цитоплазме зернистый характер. Ядра пинеалоцитов типа II более гиперхромные, содержат больше мелких глыбок гетерохроматина, чем клетки типа I. В пинеалоцитах типа Ia располагаются комплексы параллельных цистерн гранулярной эндоплазматической сети. В пинеалоцитах типа Ib – стопки Гольджи и одиночные цистерны гранулярной эндоплазматической сети. Во всех светлых клетках выявляются секреторные везикулы, синаптические сферы, ленты. Для пинеалоцитов типа Ib характерна нейрокринная

секреция, при которой секреторные везикулы диаметром 130–160 нм с плотной сердцевиной и узким светлым ореолом, производные комплекса Гольджи, возможно, транспортирующие антигонадотропный пептид и белок-носитель мелатонина, освобождаются от содержимого по мерокринному способу в булавовидных окончаниях отростков. Гормоны поступают в кровь, белок-носитель кальцинируется, формируя отложения мозгового песка в перикапиллярном пространстве и псевдовакуолях между пинеалоцитами. В клетках типа Ia находит место эпендимоподобная секреция, при которой секреторных везикул, производные гранулярной эндоплазматической сети, диаметром 180–450 нм, содержащие хлопьевидный материал, отпочковываются от перикариона.

У сеголеток рыжей полёвки индивидуального содержания при укорочении суточной фотофазы в шишковидной железе возрастает число и размеры псевдовакуолей с конкрециями. У совместно содержавшихся сеголеток весенне-летней генерации в пинеалоцитах типа Ib увеличиваются стопки Гольджи и митохондрии. Митохондриальные кристы широкие, митохондриальный матрикс частично просветлён, что свидетельствует об активизации секреторной деятельности пинеалоцитов. Гранулярные везикулы выявляются не только в булавовидных терминалях отростков пинеалоцитов, но и на периферии перикарионов вблизи псевдовакуолей с мембранами и конкрециями, то есть их содержимое отделяется не только мерокринным способом, но и почкованием (рис. 1).

При совместном содержании и укорочении фотофазы соотношение пинеалоцитов светлые : тёмные сдвигается в сторону последних. Пинеалоциты типа II имеют крупные ядрышки, многочисленные свободные рибосомы и полисомы в цитоплазме. Цистерны гранулярной эндоплазматической сети с узким просветом. Обнаруживаются единичные везикулы Гольджи. По-видимому, тёмные пинеалоциты становятся «резервными» не секреторирующими гормоны клетками. Об активизации функционирования шишковидной железы у рыжей полёвки при укорочении суточной фотофазы и моделировании стресса на высокую плотность популяции свидетельствует явление гипертрофии светлых пинеалоцитов. Их ядра, благодаря гигантским продольным складкам оболочки – «кариосомам», уподобляются кофейным зёрнам. Псевдовакуоли с конкрециями обнаруживаются вблизи перикарионов. Астроциты нередко располагаются парами или формируют более выраженные скопления, что свидетельствует о пролиферации и разрастании астроглии (рис. 2).

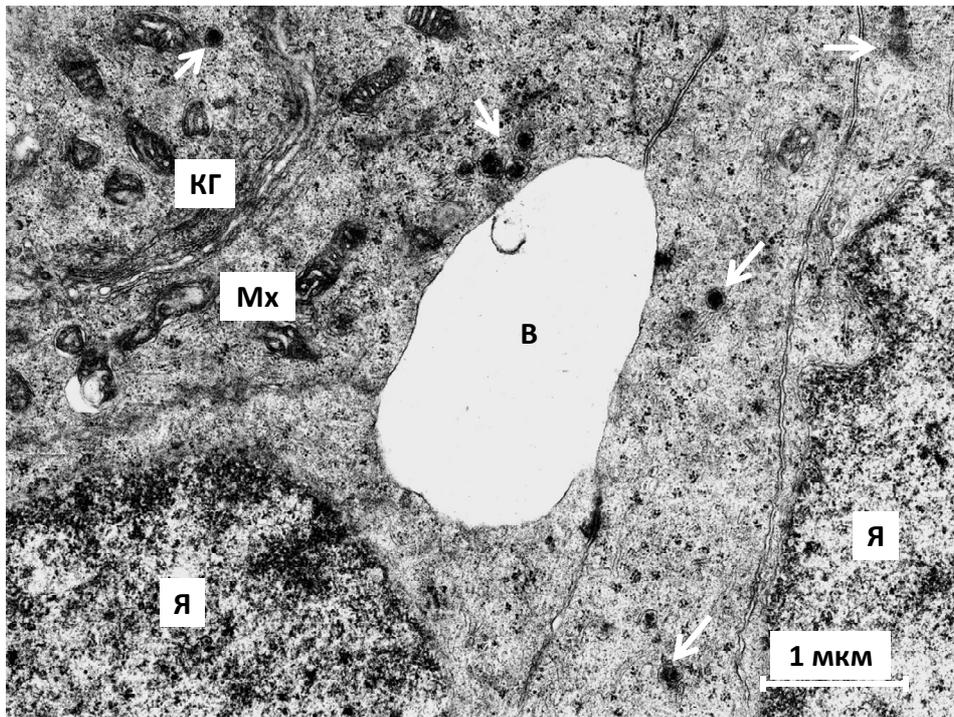


Рис. 1. Фрагмент шишковидной железы рыжей полёвки весенне-летней генерации совместного содержания: КГ – комплекс Гольджи, Мх – митохондрии, Я – ядра пинеалоцитов, В – межклеточная «вакуоль», стрелки – секреторные везикулы в перикарионе и отростке пинеалоцитов. Электронограмма

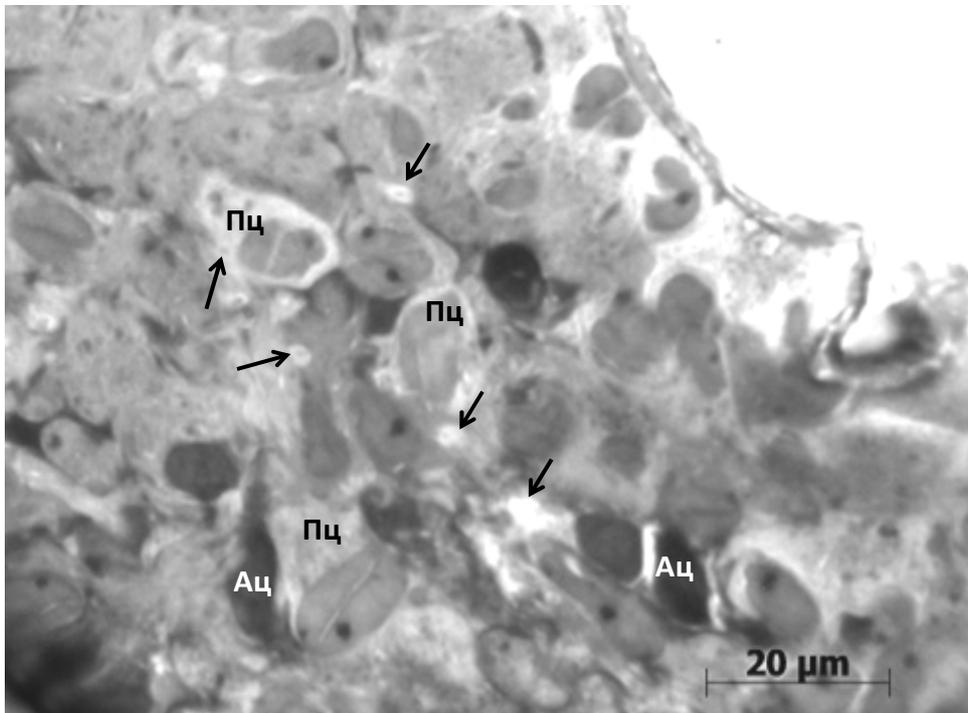


Рис. 2. Фрагмент шишковидной железы рыжей полёвки позднелетней генерации совместного содержания: Ац – астроциты, Пц – пинеалоциты, стрелки – межклеточные псевдовакуоли. Окраска азуром II.

Оценка комбинированного эффекта действия высокой плотности популяции и естественного укорочения светлого времени суток на функциональное состояние шишковидной железы двухмесячных самцов рыжей полёвки по кариометрическим и органеллометрическим показателям светлых пинеалоцитов типа Ib с использованием уравнений Уэбба свидетельствует о синергическом влиянии двух факторов на нейросекрецию. У самцов позднелетней генерации, содержащихся совместно, синергизм комбинированного действия проявляется в отношении возрастания удельного объёма комплекса Гольджи и митохондрий в цитоплазме пинеалоцитов типа Ib. Антистрессорный фотопротективный эффект (антагонизм комбинированного действия укорочения фотофазы и высокой плотности популяции) проявляется в отношении изменения морфометрических параметров компонентов белоксинтезирующего аппарата пинеалоцитов типа Ib – диаметра ядрышек и удельного объёма гранулярной эндоплазматической сети в цитоплазме, что, возможно, связано с обеспечением функционирования органа на следующий год после рождения (таблица).

Кариометрические показатели ($M \pm s$) и органеллометрические ($Me (Q_1-Q_3)$, $p < 0,05$) Ib-пинеалоцитов рыжей полёвки при укорочении фотофазы и высокой плотности популяции

Со- держание	Совместное (С)		Индивидуальное (И)		Эффект комби- нирован- ного действия
	ПЛ – поздне- летняя (n=4)	ВЛ – весенне- летняя (n=3)	ПЛ – поздне- летняя (n=3)	ВЛ – весенне- летняя (n=3)	
индекс	$i_{1,2}=1-ПЛ_C/ВЛ_И$	$i_2=1-ВЛ_C/ВЛ_И$	$i_1=1-ПЛ_И/ВЛ_И$		
$S_{Я}$, мкм ²	53,4±12,8	58,6±12,8	43,4±19,6	55,8±2,28	
$i_{S_{Я}}$	0,032	0,050	0,004		антагонизм
$d_{Як}$, мкм	1,47±0,13	1,44±0,18	1,41±0,24	1,44±0,06	
$i_{d_{Як}}$	0,007	0	0,104		антагонизм
$V_{ГЭС}$, %	1,97 (1,87–2,03)	3,70 (2,81–4,86)	2,22 (1,58–2,42)	2,60 (2,43–2,95)	
$i_{V_{ГЭС}}$	0,268	0,375	0,175		антагонизм
$V_{Мх}$, %	5,18 (4,35–6,42)	7,92 (7,48–8,29)	6,06 (5,24–6,37)	6,87 (6,81–7,42)	
$i_{V_{Мх}}$	0,273	0,111	0,150		синергизм
$V_{КГ}$, %	2,37 (2,24–3,23)	4,89 (4,65–5,16)	2,94 (1,66–3,24)	4,58 (4,31–4,74)	
$i_{V_{КГ}}$	0,477	0,079	0,351		синергизм

Примечание. $S_{Я}$ – площадь ядра, $d_{Як}$ – диаметр ядрышка, $V_{ГЭС}$ – удельный объём гранулярной эндоплазматической сети, $V_{Мх}$ – митохондрий, $V_{КГ}$ – комплекса Гольджи. ПЛ_И, ВЛ_С и ПЛ_С – доля ВЛ_И (%). Антагонизм: $i_{1,2} < (i_1+i_2) - (i_1 \times i_2)$. Синергизм: $i_{1,2} > (i_1+i_2) - (i_1 \times i_2)$.

Заключение

Таким образом, шишковидная железа у двухмесячных сеголеток-самцов рыжей полёвки имеет варибельную программу функционирования, проявляя морфологические признаки усиления секреторной активности и широкое многообразие способов секреции при моделировании высокой плотности популяции. Укорочение светлого времени суток в комбинации со стрессом на высокую плотность популяции усиливает сдвиг величины морфометрических показателей активизации секреции пинеальных гормонов, сдерживающих половое созревание, и оказывает благоприятное влияние на структурные преобразования паренхимы, связанные с обеспечением функционирования шишковидной железы на следующий год после рождения.

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. 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.
3. 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.
4. 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.
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. Кравченко Л.Б., Москвитина Н.С. Поведенческие и физиологические особенности трёх видов лесных полёвок (*Clethrionomus*, *Rodentia*, *Cricetidae*) в связи с пространственной структурой их популяции // Зоологический журнал. – 2008. – Т. 87, № 12. – С. 1509–1517.

8. Логвинов С.В., Герасимов А.В. Циркадианная система и адаптация. Морфофункциональные и радиобиологические аспекты. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. – 200 с.
9. Barrett P., Volborea M. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin // J. Pineal Res. – 2012. – Vol. 52. – P.376–388.

Рецензенты:

Алябьев Ф.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой судебной медицины с курсом токсикологической химии 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.