

УДК 597.828: 591.33: 591.176

СТАНОВЛЕНИЕ ЦИРКАДИАНЫХ РИТМОВ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПИГМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ

О.В. Бурлакова, Е.Н. Калистратова, А.А. Мацкевич,
Д.В. Попов, В.А. Голиченков

(кафедра эмбриологии)

Индивидуальное развитие организмов происходит на фоне периодических процессов, обеспечивающих их жизнедеятельность. Периодическое изменение интенсивности физиологических процессов, как правило, связано с ритмическими изменениями природных условий, что адаптирует развивающийся организм к внешней среде. Как пример таких адаптаций можно рассматривать циркадианный ритм, представляющий собой ритм функциональной активности организма с периодом, близким к периоду вращения Земли вокруг своей оси (около 24 ч). Удобной моделью для исследования биологических ритмов является пигментная система земноводных, поскольку основной эндогенный “датчик” ритмов в организме — гормон мелатонин — является у них непосредственным регулятором физиологических пигментных реакций, легко регистрируемых и при прижизненном наблюдении.

В пигментной системе травяной лягушки различают 3 типа меланофоров, синтезирующих пигмент меланин и способных перемещать по клетке пигментные гранулы. Дермальные меланофоры — крупные клетки, располагающиеся в субдермальном слое кожи и определяющие, в основном, быстрое изменение окраски покровов (физиологическая пигментная реакция) при изменении световых условий. Эпидермальные меланофоры — более мелкие клетки, обеспечивающие в большей степени морфологическое изменение окраски за счет передачи пигментных гранул кератиноцитам эпидермального слоя кожи (Fitzpatrick et al., 1966). Клетки пигментного эпителия глаза образуют однослойный листок, покрывающий снаружи нейральную сетчатку глаза, и имеют многочисленные отростки, интердигитирующие с внешними сегментами фоторецепторных клеток. Меланосомы клеток пигментного эпителия мигрируют по клеточным отросткам, экранируя фоторецепторы от избытка света. Таким образом, изменение световых условий, имеющее в природе суточную периодичность, является для всех типов меланофоров адекватным внешним раздражителем, обуславливающим перемещение пигмента в них.

Меланинсодержащие клетки пигментной системы покровов в организме регулируются изменением гормонального баланса. Вызывающий агрегацию пигментных гранул гормон мелатонин имеет в организме два основных источника — эпифизарный комплекс и глаза. Дисперсия меланосом происходит при действии гипофизарных гормонов, основным из которых является меланоцит-стимулирующий гормон (МСГ или меланотропин). Те же гормоны являются регуляторами биологических ритмов в организме и, вероятно, именно эта их функция становится основной в филогенезе. Регуляция миграций пигмента в клетках пигментного эпителия глаз до сих пор не выяснена. Показано, однако, что экзогенные мелатонин и гипофизарные гормоны вызывают перемещение пигмента в этих клетках, но только в глазах с перерезанным нервно-сосудистым пучком (Бурлакова, 1978а; Бурлакова, 1985). Имеются данные о существовании биологического ритма дермальных меланофоров и клеток пигментного эпителия глаза, который может проявляться в изменении степени дисперсии пигмента в течение суток в постоянной темноте (Roggen, 1962; Bogen-schutz, 1965; Голиченков и др., 1970; Бурлакова, 1978б), а также в изменении скорости физиологических пигментных реакций при адаптации к новым световым условиям в разное время суток (Голиченков, Попов, 1981).

Эта работа посвящена изучению становления в онтогенезе травяной лягушки околосоуточных ритмов перемещения пигмента в дермальных и эпидермальных меланофорах и клетках пигментного эпителия глаза.

Материал и методы

Материалом исследования служили личинки травяной лягушки *Rana temporaria* L. и взрослые самцы, взятые в природе. Стадии развития личинок определяли по таблицам нормального развития травяной лягушки (Kopsch, 1952). Личинок 19, 22 и 25-й стадий в течение 3 суток адаптировали к лабораторным условиям содержания (t° воды $+18^{\circ}$ — $+20^{\circ}$). Животных каждой указанной стадии

рассаживали по 3—5 штук в банки (объем воды 250 мл) и помещали в темноту. Спустя сутки по одной группе через каждые 3 ч личинок фиксировали в фиксаторе Бродского (ФСУ). У фиксированных личинок степень дисперсии пигмента в дермальных и эпидермальных меланофорах оценивали по 5-балльной шкале меланофорных индексов (mi), составленной Хогбеном и Слоумом (Hogben, Sloane, 1931) и модифицированной Д.В. Поповым и Е.Н. Калистратовой для эпидермальных меланофоров (1982). В одном и том же участке тела личинки (на “щеке” под глазом) mi определяли как среднее значение для 100 клеток. Определение проводили при помощи стереоскопического микроскопа МБС-1. Эксперимент на взрослых животных проводили по той же схеме. Определяли степень дисперсии пигмента эпидермальных меланофоров плавательной перепонки — только в этом месте сохраняется возможность индивидуального наблюдения меланофоров, поскольку после метаморфоза все остальные пигментные клетки покровов включены в хроматофорные единицы, морфологически и функционально объединяющие разные типы пигментных клеток (Bagnara, 1968).

Фиксированный материал использовали для определения состояния клеток пигментного эпителия глаза. Приготавливали парафиновые поперечные срезы головы личинки, проходящие через зрачковые отверстия обоих глаз. Толщина срезов 5—6 мкм, окраска гематоксилином по Караччи. Степень дисперсии пигмента в КПЭ глаза оценивали по ретинальному индексу — RI (Ali, 1961) — отношение длины части отростка клетки, занятой пигментом, к максимальной длине отростка. Измерения на гистологических препаратах проводили при помощи окуляр-микрометра микроскопа МБИ-3. Вычисляли RI , средний для 10 срезов трех личинок. Данные обрабатывали статистически, определяя достоверность по критерию Стьюдента при доверительном пределе $P > 0,95$.

При обработке результатов для выявления периода колебаний значений mi и RI применяли метод автокорреляционного анализа (Мерсер, 1964), используя компьютерную программу “Stadia”.

Результаты и их обсуждение

У личинок 19-й стадии (внешний критерий стадии — появление почки задней конечности) эпидермальные меланофоры практически не обнаруживают колебаний mi в течение всего времени наблюдения; а дермальные меланофоры изменяли степень дисперсии пигмента от 2,5 до 4,7 (рис. 1, А). Автокорреляционный анализ позволил выявить наличие высокочастотных низкочастотных

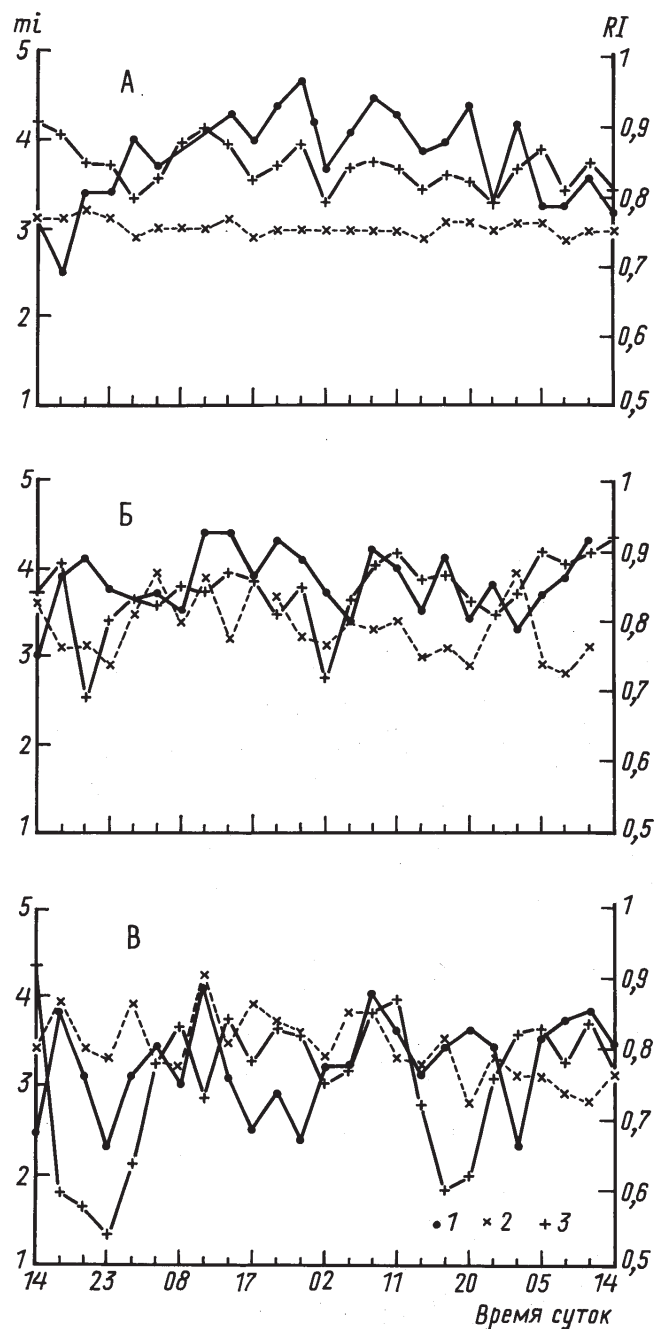


Рис. 1. Степень дисперсии пигмента в меланинсодержащих клетках пигментной системы личинок травяной лягушки в постоянной темноте.

А — 19-я стадия; Б — 22-я стадия; В — 25-я стадия развития личинок.
1 — mi дермальных меланофоров; 2 — mi эпидермальных меланофоров;
3 — RI клеток пигментного эпителия глаза

литудных колебаний степени дисперсии пигмента дермальных меланофоров, не имеющих циркадианного характера. На гистологических препаратах поперечных срезов, проходящих через центральные области глазного дна этих личинок, выявлены некоторые различия распределения пигмента в клетках пигментного эпителия глаза в разное время суток. Колебания RI незначительны (рис. 1, А) и для большей части экспериментальных точек

статистически недостоверны. При использовании метода автокорреляционного анализа периодичности колебаний выявить не удалось.

На 22-й стадии (характерный внешний признак — уплощение дистального отдела почки задней конечности) в клетках пигментного эпителия глаза выявляется четкий ритм колебаний степени дисперсии пигмента. Автокорреляционный анализ выявил период колебаний значений RI (T), составивший $27 < T < 30$ ч. На этой стадии появляются колебания степени дисперсии эпидермальных меланофоров (амплитуда изменений значений mi зарегистрирована от 2,9 до 4,0), но так же как и колебания mi дермальных меланофоров на этой стадии, они не имеют суточной периодичности. Для дермальных меланофоров изменения степени дисперсии пигмента в течение суток более выражены по сравнению с таковыми у личинок 19-й стадии развития (рис. 1, *Б*).

У личинок 25-й стадии (определяется по появлению плавательной перепонки между пальцами задней конечности) впервые обнаруживаются статистически достоверные циркадианные колебания степени дисперсии пигмента в дермальных меланофорах с периодом $27 < T < 30$ ч. (рис. 1, *В*). Характер изменения значений mi , в основном, совпадает с колебаниями RI клеток пигментного эпителия глаза, но с запаздыванием на один интервал между фиксациями. Эпидермальные меланофоры проявили колебания степени дисперсии пигмента, но четкой околосуточной периодичности выявить не удалось, и только в эпидермальных меланофорах взрослых животных обнаружены достоверные циркадианные колебания степени дисперсии пигмента с периодом также $27 < T < 30$ ч. (рис. 2), причем на главный ритм практически не налагались более высокочастотные колебания.

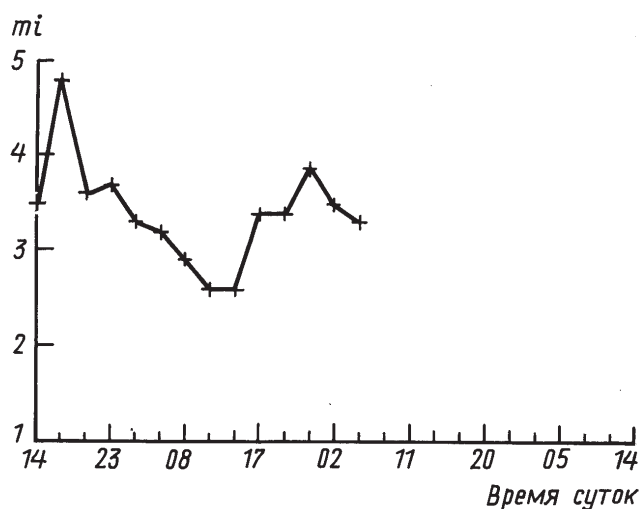


Рис. 2. Степень дисперсии пигмента в эпидермальных меланофорах взрослых травяных лягушек в постоянной темноте

Полученные результаты свидетельствуют, что первые колебания степени дисперсии пигмента в пигментной системе амфибий возникают после завершения 19-й стадии развития личинки. Интересно, что это коррелирует со временем замыкания глазной щели и началом проявления участия глаз в регуляции меланофорных реакций (Захарова, 1983). Колебания сначала аperiodичны и приобретают циркадианный характер у КПЭ к 22-й стадии развития (рис. 1, *Б*), у дермальных меланофоров — к 25-й стадии развития (рис. 1, *В*), а у эпидермальных — только после метаморфоза (рис. 2). При становлении циркадианного ритма покровных меланофоров можно наблюдать повышение амплитуды колебаний степени дисперсии пигмента и постепенное затухание высокочастотных флуктуаций, сопровождающих основной ритм. Последнее можно объяснить тем, что в процессе личиночного развития происходит, вероятно, активная подстройка собственных биоритмов источников мелатонина (эпифиза и глаз) друг к другу, что отражается на реакциях пигментных клеток покровов, находящихся под влиянием общего уровня гормона. В то же время клетки пигментного эпителия, не чувствительные к внешнему (по отношению к глазу) гормону (Бурлакова, 1978а), в онтогенезе значительно не меняют характера циркадианных колебаний RI . Несовпадение “поведения” дермальных и эпидермальных меланофоров в ходе развития личинок травяной лягушки указывает на относительную автономность разных типов пигментных клеток. Возможно, это связано с особенностями механизмов рецепторного восприятия этими клетками сигналов со стороны эндокринной системы либо с возрастными различиями созревания рецепторной системы самого меланофора.

Способность перемещать пигмент среди разных типов пигментных клеток появляется раньше всех у дермальных меланофоров — на 17-й стадии развития (Голиченков, 1979), достигая максимального проявления на 20-й; у эпидермальных меланофоров реакции появляются к 20-й стадии развития, достигая максимума к 22-й (Никерясова, Бурлакова, 1998). Клетки пигментного эпителия глаза начинают перемещать меланосомы при изменении световых условий только на 22-й стадии развития личинки, т.е. позже других типов пигментных клеток (Бурлакова, 1978б), но реакция сразу достигает своего максимального проявления. Как свидетельствуют результаты настоящего исследования, эти клетки первыми приобретают циркадианную ритмику колебаний степени дисперсии пигмента (22-я стадия), тогда как у дермальных меланофоров это происходит на 25-й стадии личиночного развития, а у эпидермальных —

уже после метаморфоза. Таким образом, функциональная зрелость клетки не коррелирует непосредственно со становлением ритмических процессов,

что вероятно указывает на различие механизмов регуляции физиологических реакций и их ритмических проявлений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бурлакова О. В. 1978а. Влияние на ретинальный эпителий гормонов, обуславливающих миграции пигмента в дермальных меланофорах // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 3. 51—57.

Бурлакова О. В. 1978б. Становление и регуляция миграций пигмента в клетках пигментного эпителия глаза при изменении световых условий в онтогенезе травяной лягушки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.

Бурлакова О. В. 1985. Об участии эпифизарного комплекса в регуляции периодических процессов в клетках пигментного эпителия глаза амфибий // Тез. докл. 2-й Всесоюз. конф. по хронобиологии, хрономедицине и хронопатологии. Т. 1. Уфа. С. 71—72.

Голиченков В. А. 1979. Биология меланофоров // Усп. соврем. биол. **87**. № 3. 442—455.

Голиченков В. А., Бурлакова О. В., Бурлаков А. Б. 1985. Влияние гипофизарных гормонов на распределение пигмента в меланофорах разных типов у личинок травяной лягушки // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 1. 24—29.

Голиченков В. А., Голиченкова И. Ф., Попов В. В. 1970. Поведение меланофоров у головастиков травяной лягушки, выращенных в темноте // Докл. АН СССР. **195**. № 5. 1219—1221.

Голиченков В. А., Нарциссова О. В. 1974. Становление и динамика миграций пигментных гранул ретинального эпителия в онтогенезе травяной лягушки // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. № 6. 14—18.

Голиченков В. А., Попов Д. В. 1981. Суточная периодичность движения пигмента как фактор, управляющий некоторыми морфофизиологическими свойствами меланофоров личинок земноводных // Тез. докл. Всесоюз. конф. "Хронобиология и хронопатология". М. С. 77.

Захарова Л. А. 1983. Влияние световых условий на развитие меланиновой пигментации в онтогенезе амфибий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.

Мерсер Д. 1964. Аналитические методы исследования периодических процессов, замаскированных случайными флуктуациями // Биологические часы / Под ред. С.Э. Шноля. М.

Никерясова Е. Н., Бурлакова Е. А. 1998. Становление физиологических и морфологических реакций пигментной системы в онтогенезе амфибий // Пространственно-временная организация онтогенеза / Под ред. В.А. Голиченкова, Ю.А. Романова. М. С. 147—153.

Попов Д. В., Калистратова Е. Н., Калужина Н. Н. 1982. Влияние рентгеновского облучения на морфофизиологические реакции эпидермальных меланофорных клеток у личинок *Rana temporaria* // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. № 3. 29—35.

Ali M. A. 1961. Histophysiological studies on the juvenile *Athlantic salmon* retina. 1. Rates of light- and dark-adaptation // Canad. J. Zool. **39**. 455—457.

Bagnara J. T., Taylor I. D., Hedley M. E. 1968. The dermal chromatophore unit // J. Cell Biol. **38**. N 1. 67—79.

Bogenschütz H. 1965. Untersuchungen über den Lichtbedingten Farbwechsel der Kaulquappen // Zf. vergl. Physiol. **50**. 598—614.

Fitzpatrick T. B., Quevedo W. C., Leveno A. L. et al. 1966. Terminology of vertebrate melanin-containing cells // Science. **152**. 88—89.

Hogben L., Slome D. 1931. The pigmentary effector system // Proc. Roy. Soc. **108**. N 1. 10—53.

Kopsch Z. 1952. Die Entwicklung des braunen Grassfrosches *Rana fusca* Roesel. Stuttgart.

Minkiewicz R. 1937. The Nycthemeral rhythm of coloration in its complex in photoptic determinism in adult frog // XII Congress international de Zoologie, Comptes Rendus. **2**. 793—798.

Roggen D. 1962. Diurnal rhythm in the melanophores of *Rana temporaria* // Naturwissenschaften. **49**. N 20. 478.

Поступила в редакцию
04.11.98

THE DEVELOPMENT OF CIRCADIAN RHYTHMS OF PHYSIOLOGICAL REACTIONS OF THE PIGMENT SYSTEM IN ONTOGENESIS OF ANURA

O.V. Burlakova, E.N. Kalistratova, A.A. Matskevitch,
D.V. Popov, V.A. Golitschenkov

It was researched fluctuations of a degree of melanosome's dispersion in pigment cells of tadpoles grass frog (*Rana temporaria* L.) during it's stay in darkness. It was determined, that fluc-

tuations at first in cells of a retinal epithelium of eye (CRE) are appeared, then in dermal melanophores and after all in epidermal melanophores. The pattern of development of circadian rhythms has similar character in all researched melanincontaining cells: the oscillations are at first aperiodical and it gain circadian character in CRE to 22-th stage of larval development (Kopsch, 1952), in dermal melanophores — to 25-th, and for epidermal ones only after a metamorphosis. During development of a circadian rhythms is observed the increase of an amplitude of fluctuations of melanosome's dispersion in pigment cells and the gradual decrease of high-frequency oscillations accompanying a main rhythm.