© Коллектив авторов, 2020
УДК 599.742.1:591.147.5
doi: 10.34922/AE.2020.158.4.005

С. Н. Калинина [1], В. А. Илюха [1], Л. Б. Узенбаева [1], Е. П. Антонова [1], Е. С. Брулер [2], И. И. Окулова [3]

МЕЛАНИН В ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА ПСОВЫХ

[1] Лаборатория экологической физиологии животных (зав. — канд. биол. наук С. Н. Калинина), Институт биологии ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр Российской академии наук»; [2] Институт биологии, экологии и агротехнологий (дир. — канд. сельхоз. наук Н. А. Онищенко), ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»; [3] отдел ветеринарии (дир. — д-р вет. наук проф. И. А. Домский), ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б. М. Житкова»

Цель — проанализировать наличие меланина и оценить частоту встречаемости пигментированных шишковидных желёз (ШЖ) у псовых разных возрастных групп.

Материал и методы. Объекты исследования — енотовидная собака (Nyctereutes procyonoides Grey), лисица (Vulpes vulpes L.) и песец (V. Lagopus L.). У неполовозрелых, или ювенильных (6–8 мес), и половозрелых (1,5–3,5 лет) самок животных каждого вида визуально оценивали наличие пигментации ШЖ и подсчитывали доли (%) пигментированных и непигментированных желёз. Число неполовозрелых и взрослых животных каждого вида было следующим: енотовидной собаки (n=4, n=15), лисицы (n=15, n=28) и песца (n=14, n=14 соответственно). Морфологические особенности ШЖ изучали гистологическими методами исследования, срезы окрашивали гематоксилином — эозином, а также по Массону—Фонтана.

Результаты. В ШЖ исследованных видов обнаружены скопления пигмента меланина как на периферии железы, так и возле кровеносных сосудов. Визуально зафиксирована большая вариабельность пигментации желёз: от непигментированных до интенсивно пигментированных. На частоту встречаемости пигментированных желёз оказывали влияние возраст и видовая принадлежность. У енотовидных собак пигментированные эпифизы наблюдались только у неполовозрелых особей (25%), у лисиц — только у взрослых (21,4%). У песцов они были характерны для обеих возрастных групп, но с возрастом их доля снижалась (с 21,4 до 7,1%).

Выводы. Обнаружена широкая вариабельность степени пигментации ШЖ у псовых. Частота встречаемости пигментированных ШЖ характеризуется видоспецифичностью и зависит от возраста животных.

Ключевые слова: *шишковидная железа, псовые, меланин, мелатонин*

Введение. Меланин — это эндогенный мелкодисперсный коричнево-чёрный пигмент, который образуется в меланоцитах при окислении тирозина до дигидроксифенилаланина, катализирует реакцию фермент тирозиназа. Хорошо известна защитная функция эпителиального меланина, однако, у позвоночных пигмент также может накапливаться во внутренних органах, участвуя в их развитии и функционировании, а также выполняя защитную функцию при окислительном стрессе, гипоксии, ультрафиолетовом облучении и нагрузке поллютантами [10].

Особый интерес представляет исследование накопления меланина в шишковидной железе (ШЖ) млекопитающих. Являясь нейроэндокринным преобразователем информации об освещённости в гормональный сигнал, а именно, повышая уровень своего основного продукта — гормона мелатонина — в тёмное время суток/ года, железа участвует в регуляции суточного ритма и сезонных изменений физиологических функций животных [1].

Наличие меланина в ШЖ было описано у грызунов [5, 6], зайцеобразных [11], парнокопытных [13, 14], непарнокопытных [9], хищных [7, 8], рукокрылых [2], а также у человека [12]. В этих работах среди возможных причин пигментации ШЖ рассматриваются особенности ее строения и развития в зависимости от возраста, пола, стадии полового цикла, а также в условиях пол-

Сведения об авторах:

Калинина Светлана Николаевна (e-mail: cvetnick@yandex.ru), *Илюха Виктор Александрович, Узенбаева Людмила Борисовна, Антонова Екатерина Петровна*, лаборатория экологической физиологии животных, Институт биологии, ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр Российской академии наук», 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Брулер Екатерина Сергеевна, Институт биологии, экологии и агротехнологий, ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33

Окулова Ираида Ивановна, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б. М. Житкова», 610000, г. Киров, Преображенская ул., 79

ной темноты, однако результаты этих исследований противоречивы.

В настоящее время причины накопления пигмента в ШЖ и его физиологическое значение до конца не ясны. В связи со слабой изученностью этого вопроса является актуальным продолжение подобных исследований у других видов млекопитающих, в том числе близкородственных видов семейства Canidae (Carnivora) — енотовидной собаки, лисицы и песца. Это моноэстричные, сезонно размножающиеся животные, которые становятся половозрелыми в 9–11 мес, их максимальная продуктивность приходится примерно на 3-летний возраст. Сведения о строении ШЖ у этих видов в доступной литературе скудны или отсутствуют и не содержат какой-либо информации о возможном присутствии меланина [4].

Целью исследования — изучить наличие меланина в ШЖ, а также оценить частоту встречаемости пигментированных желёз у неполовозрелых и взрослых особей трёх видов млекопитающих семейства Canidae — енотовидной собаки, лисицы и песца.

Материал и методы. Исследование выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ «Карельский научный центр Российской академии наук» с разрешения этического комитета ИБ КарНЦ РАН (протокол № 1 от 15.01.2018 г.) и с соблюдением международных принципов Директивы Евросоюза 2010/63/EU о гуманном отношении к экспериментальным животным. Объектами исследования явились самки представителей семейства Canidae: енотовидная собака (Nyctereutes procyonoides Grey), лисица (Vulpes vulpes L.) и песец (V. Lagopus L.), разводимые в условиях звероводческой фермы. Животные получали рацион согласно рекомендациям для этих видов и воду ad libitum. Эксперимент проводился в декабре, когда звери находились в состоянии репродуктивного покоя. Шишковидные железы от 2 групп животных каждого вида разных возрастов — неполовозрелые, или ювенильные (6–8 мес), и половозрелые (1,5–3,5 лет) — извлекали, подсчитывали доли (%) непигментированных и пигментированных, затем анализировали с помощью гистологических методов. Число неполовозрелых и взрослых животных каждого вида было следующим: енотовидной собаки (n=4, n=15), лисицы (n=15, n=28) и песца (n=14, n=14 соответственно).

ШЖ фиксировали в 10% забуференном растворе формальдегида при комнатной температуре, затем обезвоживали в спиртах восходящей концентрации с последующим приготовлением парафиновых срезов толщиной 0,5–0,8 мкм. Морфологические особенности ШЖ изучали на срезах, окрашенных гематоксилином — эозином, а также по Массону—Фонтана для выявления меланина. Депигментация контрольных срезов проведена с помощью отбеливателя Маллори до импрегнации серебром. Препараты впоследствии изучались с использованием светового микроскопа AxioScope.A1 (Zeiss, Германия). Статистическая обработка данных включала дисперсионный анализ (одно- и многофакторный ANOVA) и критерий χ^2, статистически значимыми считали различия при $p<0,05$.

Результаты исследования. Шишковидная железа является частью эпиталамуса промежуточного мозга и располагается в углублении между двумя передними холмиками пластинки четверохолмия среднего мозга вблизи от III желудочка мозга. Согласно классификации [15], ШЖ псовых относится к типу А или АВ. Её цвет варьирует от светло-серого до розового. Форма может быть округлой или конической. Снаружи железа покрыта пиальной капсулой. В паренхиме доминируют пинеалоциты, также видны глиальные клетки, кровеносные сосуды, пигменты.

У трёх видов псовых, наряду с железами обычного светлого цвета, были обнаружены эпифизы, в которых пигментация затрагивала либо отдельную область, чаще — вентральную поверхность дистальной части или правую половину, либо целую железу (*рис. 1*).

Визуально ШЖ подразделяли на непигментированные и пигментированные. При исследовании срезов непигментированных желёз были отмечены единичные очаги скопления пигментных гранул, в основном на периферии дистальной части под капсулой, тогда как в паренхиме они располагались хаотично (*рис. 2, а*). На срезах пигментированных желёз обнаружены массивные скопления округлых тёмно-коричневых пигментных гранул разного размера, которые обволакивали ядро или заполняли отростки клеток (см. рис. 2, б–е). Клетки, содержащие пигмент, располагались преимущественно возле кровеносных сосудов. Гистохимический анализ показал, что пигмент является меланином. Это подтверждалось наличием аргентаффинной реакции при окраске по Массону—Фонтана (см. рис. 2, г).

Среди особей енотовидных собак пигментация железы выявлена только в одном случае — у неполовозрелого зверя. Среди лисиц, напротив, пигментированные ШЖ выявлялись исключительно у взрослых животных в 21,4% случаев. Среди песцов этот показатель снижался с возрастом с 21,4 до 7,1%. Многофакторный ANOVA показал значимое совместное влияние факторов видовой принадлежности и возраста на частоту встречаемости пигментированных ШЖ ($df=2$; $F=3,76$; $p<0,05$). По данным однофакторного ANOVA, фактор возраста оказывал влияние на исследуемый показатель только у енотовидных собак, тогда как критерий χ^2 показал значимое влияние возраста у всех исследованных видов (*таблица*).

Обсуждение полученных данных. Результаты исследований морфологических особенностей ШЖ у млекопитающих противоречивы: одни исследователи отмечают наличие в ней меланина [2, 5–9, 11–14], другие — нет [3]. В визуаль-

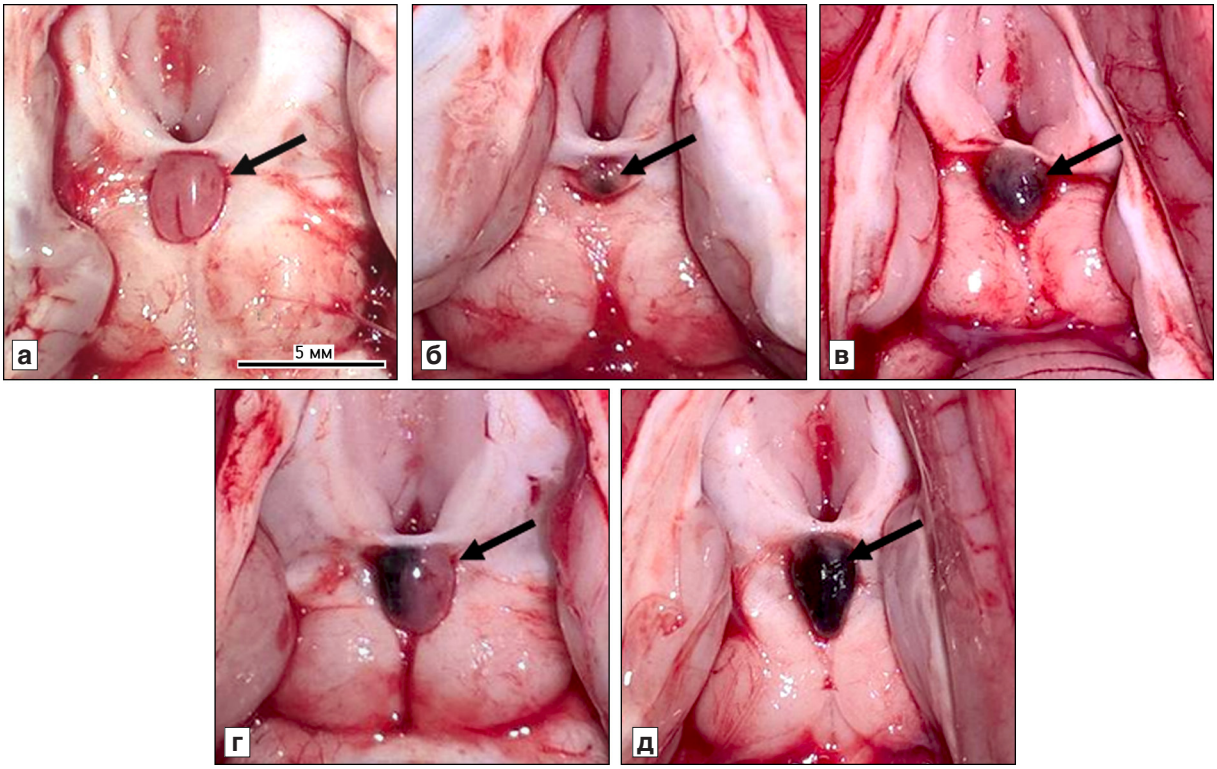

Рис. 1. Различная степень пигментации ткани шишковидной железы (стрелка) песца.

а — пигментация отсутствует; б — низкая; в, г — средняя; д — высокая. Каудально-дорсальный вид части мозга после рассечения полушарий и при отодвинутом мозжечке

но непигментированных эпифизах исследованных нами видов животных гранулы меланина встречались в небольшом количестве и в основном на периферии дистальной части железы, под капсулой. Среди представителей семейства псовых пинеальный меланин был выявлен ранее только у собак [7]. Наряду с этим, считается, что лошади и крупный рогатый скот способны накапливать в своих ШЖ значительное количество пигмента [9, 14]. Результаты нашего исследования позволяют дополнить список видов млекопитающих, характеризующихся интенсивно пигментированными ШЖ. Нами была зафиксирована большая вариабельность пигментации ШЖ у изученных видов псовых, что согласуется с данными, полученными не только на собаках, но и на летучих мышах [2]. Пигментированные участки чаще всего располагались на вентральной поверхности дистальной части органа либо на правой половине железы. У кошки пигментные клетки также обнаружены преимущественно на вентральной поверхности дистальной части железы [8], у собаки, напротив, — в проксимальной части возле задней спайки [7]. Эти межвидовые различия, вероятно, обусловлены расположением предшественников пигментных клеток во время эмбрионального развития у разных видов.

На срезах пигментированных желёз псовых массивные скопления округлых тёмно-коричневых пигментных гранул разного размера, обволакивающие ядро и/или заполняющие отростки клеток, находились преимущественно возле кровеносных сосудов, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [6, 14]. У крупного рогатого скота наружная оболочка большинства кровеносных сосудов ШЖ была обильно покрыта массами меланина, в интенсивно окрашенных областях пигмент проникал через эндотелиальные клетки в кровеносные сосуды [14].

Несмотря на то, что меланогенез происходит в меланоцитах, пинеалоциты и интерстициальные клетки также могут содержать его небольшое количество, по всей вероятности, в результате трансфера меланосом [2, 8].

Причины накопления и биологическое значение пигмента в ШЖ до конца не ясны. Среди факторов, ответственных за пигментацию ШЖ, рассматривают особенности её развития и строения [1, 2, 14], в том числе гомологию железы и пигментного эпителия сетчатки глаза. На пигментацию железы также может оказывать влияние функциональная взаимосвязь между ШЖ и другими эндокринными железами. Полагают

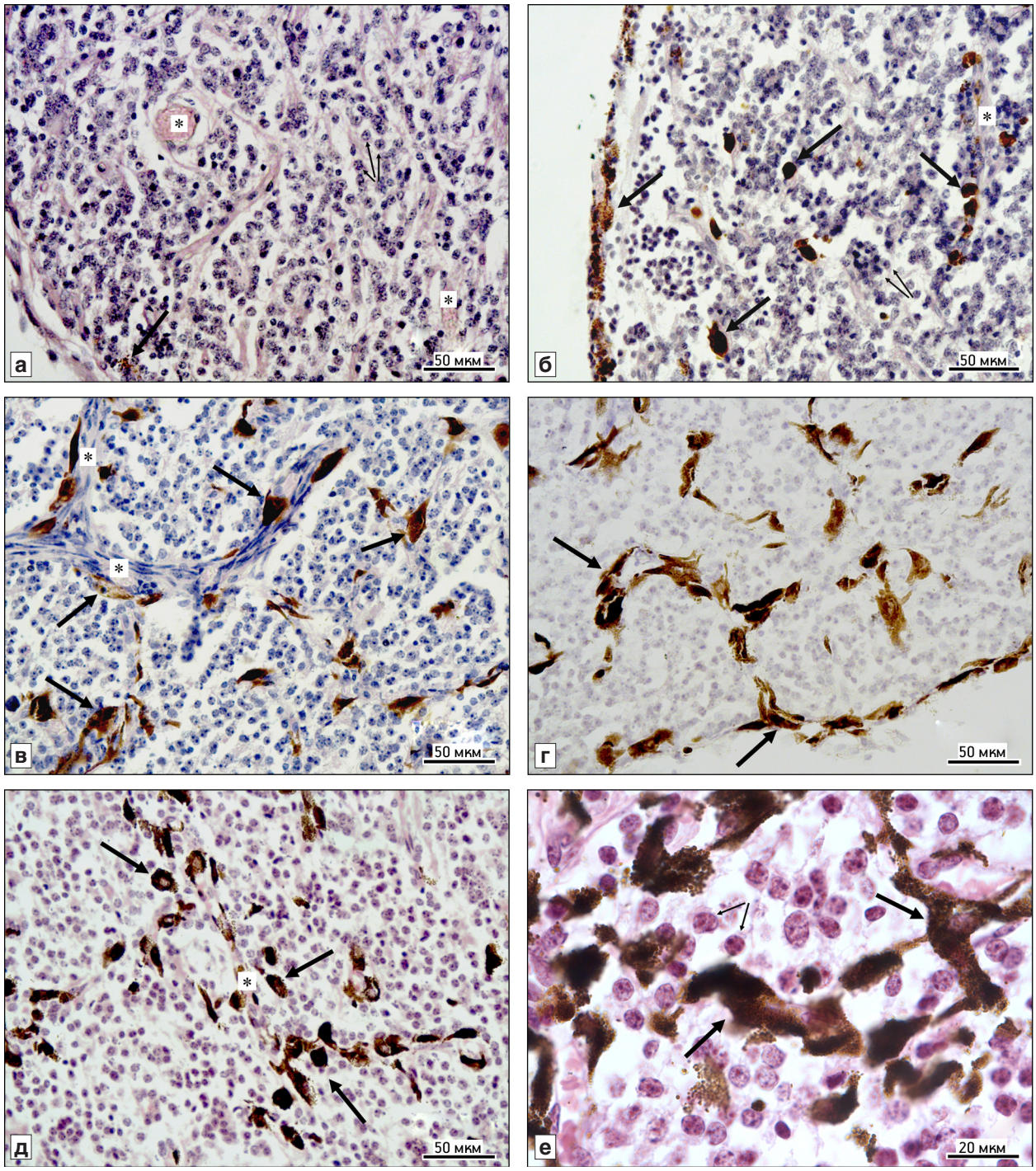

Рис. 2. Непигментированные (а) и пигментированные (б–е) шишковидные железы представителей семейства псовых.

а — единичные скопления меланина на периферии железы неполовозрелой лисицы; б — отдельные пигментные клетки и скопления меланина вблизи капсулы железы у половозрелой лисицы; в, г — локализация пигментных клеток вблизи кровеносных сосудов и на периферии железы половозрелого песца; д, е — обширные скопления меланина, пигмент локализован вокруг ядер клеток и в их отростках в железе неполовозрелой енотовидной собаки. Тонкая стрелка — пинеалоциты; толстая стрелка — скопления меланина; * кровеносный сосуд. Окраска: а–г, е — гематоксилином — эозином; д — по Массону—Фонтана

[12], что вследствие ингибирующего действия мелатонина на высвобождение меланоцитстимулирующего гормона из гипофиза экзоцитоз гранул меланина из цитоплазмы прекращается, и пигмент накапливается в клетках эпифиза.

Учитывая регуляторное действие ШЖ на половую функцию млекопитающих, принадлежность и(или) изменения репродуктивного статуса организма, вероятно, могут оказывать влияние на ее пигментацию. Пинеальный меланин был

Влияние возраста на частоту встречаемости пигментированных шишковидных желёз у псовых

Виды животных	Возрастные группы	Отношение непигментированных желёз к пигментированным, %	Влияние возраста на частоту встречаемости пигментированных желёз	
			ANOVA	Критерий χ^2
Енотовидная собака	Ювенильные (n=4)	75:25	df=1; F=4,47 p<0,05	χ^2=24,36; df=1 p<0,01
	Половозрелые (n=15)	100:0		
Лисица	Ювенильные (n=15)	100:0	df=1; F=3,90 p>0,05	χ^2=8,23; df=1 p<0,05
	Половозрелые (n=28)	78,6:21,4		
Песец	Ювенильные (n=14)	78,6:21,4	df=1; F=1,13 p>0,05	χ^2=10,29; df=1 p<0,05
	Половозрелые (n=14)	92,9:7,1		

обнаружен у неполовозрелых овец, но отсутствовал у особей в пубертатном и постпубертатном периодах [13]. Самки вискачи характеризовались бóльшим числом пигментных клеток по сравнению с самцами, причём в период беременности этот показатель возрастал [5, 6]. Неоднозначные результаты были получены E. Santamarina [14], который обнаружил пигментированные железы в 67 % случаев у бычков, в 49,6 % — у кастратов в возрасте 1,5–2 лет, в 8,5 и 5,4 % случаев — у небеременных и беременных коров соответственно, тогда как у телят в возрасте 1,5 лет и у быков в возрасте 4–5 лет пигмент в эпифизе зафиксирован не был.

Тем не менее, другие исследователи считают присутствие меланина в ШЖ постоянной характеристикой [7, 8] и не обнаруживают связи между количеством пигмента и возрастом [2, 7, 9], полом [2, 7, 12] или репродуктивным статусом [7]. Высказывается мнение, что, скорее всего, количество пигментных клеток не связано ни со зрелостью железы, ни с половым созреванием [7], поскольку пигмент обнаруживается на эмбриональной стадии развития [11], когда паренхима железы содержит незрелые пролиферирующие клетки.

В ходе нашего исследования показано значимое влияние возраста и видовой принадлежности на частоту встречаемости пигментированных желёз у псовых. Так, если у енотовидных собак пигментация эпифиза обнаружена только у ювенильных особей (25 %), у лисиц — только у половозрелых животных (21,4 %), то для песцов пигментированные органы были характерны для обеих возрастных групп, но с возрастом их доля снижалась (с 21,4 до 7,1 %).

Заключение. В мозгу представителей семейства псовых зафиксирована большая вариабельность пигментации шишковидной железы: от непигментированных до интенсивно пигментированных. Частота встречаемости пигментированных желёз у этих животных характеризуется видоспецифичностью и зависит от возраста. Поскольку причины накопления и биологическое значение меланина в ШЖ млекопитающих ясны не до конца, существует необходимость в дальнейших исследованиях этого вопроса.

Благодарности

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0073). Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам ИБ КарНЦ РАН канд. биол. наук Е. А. Хижкину и А. В. Морозову, работникам ЗАО «Пряжинское», ФГУП «Русский соболь» (лично селекционеру канд. биол. наук З. С. Ручкиной) и ООО «Зверохозяйство „Вятка”» за помощь при работе с животными.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: С. Н. К., В. А. И.
Сбор и обработка материала: С. Н. К., Е. П. А., Е. С. Б., И. И. О.
Статистическая обработка данных: С. Н. К., В. А. И.
Анализ и интерпретация данных: С. Н. К., В. А. И., Л. Б. У.
Написание текста: С. Н. К., В. А. И., Л. Б. У.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко Р. И., Поленов А. Л. Эндокринная система. Эпифиз // Руководство по гистологии / Под ред. Р. К. Данилова. СПб.: СпецЛит, 2011. Ч. 1. С. 694–703 [Kovalenko R. I., Polenov A. L. Endocrine system. Pineal gland // Rukovodstvo po gistologii / Ed. by Danilov R. K. SPb.: Spetslit, 2011. Part 1. P. 694–703. In Russ.].
2. Bhatnagar K. P., Hilton F. K. Observations on the pineal gland of the big brown bat, Eptesicus fuscus: possible correlation of melanin intensification with constant darkness // Anat. Rec. 1994. Vol. 240 (3). P. 367–376.
3. Bolat D., Kürüm A., Canpolat S. Morphology and quantification of sheep pineal glands at pre-pubertal, pubertal and post-pubertal periods // Anat. Histol. Embryol. 2018. Vol. 47 (4). P. 338–345.
4. Bulc M., Lewczuk B., Prusik M. et al. Calcium concrements in the pineal gland of the Arctic fox (Vulpes lagopus) and their relationship to pinealocytes, glial cells and type I and III collagen fibers // Polish. J. Vet. Sci. 2010. Vol. 13 (2). P. 269–278.
5. Busolini F. I., Rosales G. J., Filippa V. P., Mohamed F. H. A seasonal and age-related study of interstitial cells in the pineal

gland of male viscacha (Lagostomus maximus maximus) // Anat. Rec. 2017. Vol. 30 (10). P. 1847–1857.

6. Busolini F. I., Rodríguez G. B., Filippa V. P., Mohamed F. H. Pigmented cells in the pineal gland of female viscacha (Lagostomus maximus maximus): a histochemical and ultrastructural study // Int. J. Endocrinol. 2017. P. 1–8.
7. Calvo J., Boya J., García-Mauriño J. E., Lopez-Carbonell A. Structure and ultrastructure of the pigmented cells in the adult dog pineal gland // J. Anat. 1988. Vol. 160. P. 67–73.
8. Calvo J. L., Boya J., García-Mauriño J. E., Rancaño D. Presence of melanin in the cat pineal gland // Acta Anat. 1992. Vol. 145 (1). P. 73–78.
9. Capucchio M. T., Márquez M., Pregel P. et al. Parenchymal and vascular lesions in ageing equine brains: histological and immunohistochemical studies // J. Comp. Pathol. 2010. Vol. 142 (1). P. 61–73.
10. Dubey S., Roulin A. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins // Pigment Cell. Melanoma Res. 2014. Vol. 27 (3). P. 327–338.
11. García-Mauriño J. E., Sicilia C., Boya J., Calvo J. L. Embryonic development of the rabbit pineal gland (Oryctolagus cuniculus)(Lagomorpha) // Eur. J. Anat. 2014. Vol. 5 (2). P. 55–66.
12. Koshy S., Vettivel S. Melanin pigments in human pineal gland // J. Anat. Soc. India. 2001. Vol. 50 (2). P. 122–126.
13. Redondo E., Regodon S., Masot A. J. et al. Postnatal development of female sheep pineal gland under natural inhibitory photoperiods: an immunocytochemical and physiological (melatonin concentration) study // Histol. Histopathol. 2003. Vol. 18. P. 7–17.
14. Santamarina E. Melanin pigmentation in bovine pineal gland and its possible correlation with gonadal function // Can. J. Biochem. Physiol. 1958. Vol. 36 (1). P. 227–235.
15. Vollrath L. The pineal organ. In: Handbuch Der Mikroskopischen Anatomie Des Menschen. Vol. 7. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1981.

Поступила в редакцию 11.07.2019
Получена после доработки 08.11.2019

MELANIN IN THE PINEAL GLANDS OF CANIDAE

S. N. Kalinina [1], V. A. Ilyukha [1], L. B. Uzenbaeva [1], Ye. P. Antonova [1], Ye. S. Bruler [2], I. I. Okulova [3]

Objective — to study the presence of melanin in the pineal gland (PG) and to assess the frequency of the pigmented glands occurrence in Canidae of different age groups.

Material and methods. The objects of the research were raccoon dog (Nyctereutes procyonoides Grey), fox (Vulpes vulpes L.) and Arctic fox (V. lagopus L.). In immature (6–8 months) and adult (1,5–3,5 years) females of each species, the presence of the PG pigmentation was visually assessed and the proportion (%) of the pigmented and non-pigmented PG was calculated. The number of immature and adult animals was as follows: raccoon dog — n=4, n=15, fox — n=15, n=28, Arctic fox — n=14, n=14, accordingly. PG morphology was studied by histological methods; the sections were stained with hematoxylin and eosin and according to Masson-Fontana technique.

Results. Clusters of melanin in the PG of studied species were located both on the periphery of the gland and near the blood vessels. The great variability of the PG pigmentation was detected. The age and the species membership affected the frequency of pigmented PGs findings. In raccoon dogs pigmented PGs were observed in immature individuals only (25 %), in foxes — in adults only (21,4 %). In blue foxes pigmented PGs were characteristic of both age groups, but with age their proportions decreased (from 21,4 to 7,1 %).

Conclusions. A great variability in the degree of PG pigmentation was demonstrated. The frequency of the pigmented glands occurrence in Canidae is species-specific and depends on the age of the animals.

Key words: *pineal gland, Canidae, melanin, melatonin*

[1] Laboratory of Animal Ecological Physiology, Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk 185910; [2] Institute of Biology, Ecology and Agrotechnology, Petrozavodsk State University, 33 Lenina Pr., Petrozavodsk 185910; [3] Veterinary Department, prof. B. M. Zhitkov Russian Game Management and Fur Farming Research Institute, 79 Preobrazhenskaya St., Kirov 610000