

© А.Б. Киладзе, Н.К. Джемухадзе, 2010
УДК 611.773:599.323.4

А.Б. Киладзе и Н.К. Джемухадзе

АНАЛИЗ ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ САЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗ КОПЕТДАГСКОЙ ПОЛЕВКИ

Лаборатория морфологических адаптаций позвоночных (зав. — д-р биол. наук О.Ф. Чернова) Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва

В работе представлены результаты полуколичественной обработки гистохимической активности фосфатаз сальных желез копетдагской полевки (*Microtus socialis paradoxus* Ognev et Heptner, 1928). Работа свелась к переводу стандартных гистохимических обозначений активности ферментов в цифровые аналоги, позволяющие оценить степень ферментной активности и полового диморфизма. У самцов индекс ферментной активности кислой фосфатазы летом больше, чем зимой, на 16%. У самок этот показатель зимой меньше, чем летом, при этом разница составила 28%. Индекс ферментной активности щелочной фосфатазы у самцов летом на 4% больше, чем зимой. Такие же различия в зависимости от сезона имеются и у самок. Показатели активности аденозинтрифосфатазы у самцов в июле были несколько выше, чем в декабре, однако у самок наблюдается противоположная картина — значения активности летом на 16% меньше, чем зимой. Половой диморфизм активности кислой фосфатазы больше летом, чем зимой. Индекс полового диморфизма активности щелочной фосфатазы летом в 2 раза меньше, чем зимой, однако их фактические значения невелики. Максимальный половой диморфизм наблюдается в активности аденозинтрифосфатазы в летний период, при этом зимой он сильно снижается (с 27,0 до 4,0%).

Ключевые слова: сальные железы, фосфатазы, гистохимическое выявление, полуколичественный анализ, копетдагская полевка (*Microtus socialis paradoxus*).

Известно, что по своему характеру гистоэнзиматические реакции имеют качественный характер, однако существующие в настоящее время вариативность обозначения активности ферментов и различное количество градаций степени гистохимической активности, с точки зрения единства подходов к пониманию гистохимии ферментов нельзя признать эффективными. В этой связи для более объективных научных выводов и количественной интерпретации качественных состояний тканевой и клеточной организации живой материи целесообразно использовать в гистохимических исследованиях полуколичественные методы анализа.

Согласно высказыванию известного гистохимика Ханса Луппы (Hans Lippa), выражаемая в относительных единицах интенсивность гистохимической реакции представляет собой более объективную оценку результатов опыта, чем простое наблюдение [8].

Среди обширного класса полуколичественных методов особое место занимает квалитетический анализ, заключающийся в придании цифрового аналога определенной градации (степени) гистоэнзиматической активности, который позволяет полноценно использовать статистический аппарат для выявления скрытых закономерностей, имеющих важное биологическое значение.

В этой связи цель настоящей работы — показать сезонно-половую изменчивость гистоэнзиматической активности кожных желез, исполь-

зуя полуколичественный анализ, раскрывающий широкие возможности для таксономических реконструкций.

Материал и методы. Исследованы по 5 взрослых разнополых особей копетдагской полевки *Microtus socialis paradoxus* Ognev et Heptner, 1928, отловленных в Юго-Западной Туркмении (хребет Копетдаг) в летний и зимний период, т.е. всего в опыте находились 20 особей (длина тела без хвоста — 10,2 см, масса — 45 г). В июле и декабре у животных, находящихся в лабораторных условиях, был взят материал с загривка, верхних век, углов рта, анальной области, а также оволосенной части подошв лап. Изучали сальные железы кожного покрова. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине на холоде до 24 ч. Толщина замороженных «плавающих» срезов составила 15 мкм. Гистохимические реакции выявления кислой фосфатазы (КФ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и аденозинтрифосфатазы (АТФазы) проводили по методикам Гомори [1] при соблюдении условий идентичной параллельной обработки материала и контрольных реакций без субстрата в модификациях, специально отработанных Н.К. Джемухадзе для кожных желез. Длительность инкубации ($t=37^{\circ}\text{C}$) для реакции на КФ с использованием ацетатного буфера (pH 5,0) составила 2,0 ч; на ЩФ с использованием трис-буфера (pH 9,2) — 1,5 ч; на АТФазу с использованием трис-буфера (pH 7,2) — 2,0 ч. Для морфологической идентификации структур произведена окраска гематоксилином Карацци [9].

Препараты изучали с помощью микроскопа марки Carl Zeiss (Германия). Результат фиксировали на основе просмотра каждого среза, последовательно смещая поле зрения микроскопа, при этом у каждой особи в каждом топографическом участке были исследованы по 5–10 желез.

Для создания шкалы провели ранжирование активности ферментов кожных желез с цифровым представлением

результатов (табл. 1). Цифровые данные были подвергнуты статистической обработке (расчет средней арифметической, ошибки средней и коэффициента Стьюдента). В ходе применения дисперсионного анализа проводили расчет общей, общедисперсионной и остаточной дисперсий, что позволило выявить влияние пола, сезона, а также совместного действия этих факторов на ферментную активность кожных желез. Значимость факторов определяли по критерию Фишера [7].

Расчет индексов позволяет оценить уровень ферментной активности и степень полового диморфизма. Индекс ферментной активности рассчитывали по формуле:

$$K_{\text{Enzyme}} = \frac{A_{\text{fact}}}{A_{\text{max}}} \times 100,$$

где K_{Enzyme} — индекс ферментной активности, %; A_{fact} — фактическая активность фермента, баллы; A_{max} — максимальное значение активности фермента, равное 5 баллам.

Индекс полового диморфизма рассчитывали по формуле:

$$K_{\sigma-\varphi} = \frac{(K_{\text{Enzyme}}^{\sigma} - K_{\text{Enzyme}}^{\varphi})}{K_{\text{Enzyme}}^{\sigma}} \times 100,$$

где $K_{\sigma-\varphi}$ — индекс полового диморфизма, %; $K_{\text{Enzyme}}^{\sigma}$ — большее значение индекса ферментной активности в системе «самцы—самки», %; $K_{\text{Enzyme}}^{\varphi}$ — меньшее значение индекса ферментной активности в системе «самцы — самки», % [5, 6].

Результаты исследования. У всех полевок подсемейства Microtinae слюнные железы альвеолярного типа. Гисто- и цитохимически продукты выявления ферментов распределялись следующим образом: КФ — в виде мелкой темной зернистости во всех типах клеток, при этом ее содержание в зрелых секреторных клетках около протоков железы варьировало. Специфический продукт реакции на ЩФ представлял собой диффузно распределенную массу коричнево-серых оттенков, которая в высоких концентрациях

содержалась в малодифференцированных и созревающих клетках; продукт реакции на этот фермент хорошо маркировал эндотелий кровеносных капилляров. АТФазу определяли по красно-коричневому осадку варьирующих оттенков, при этом он был плотнее в малодифференцированных клетках, чем в зрелых. Такая картина связана с процессами секретобразования, а внутриклеточное расположение осадка — с цитологической и цитохимической локализацией изученных ферментов (лизосомы, митохондрии, мембранные структуры).

Топографическая изменчивость гистоэнзиматической активности слюнных желез составила основу для проведения статистического анализа, результаты которого представлены в табл. 2.

Анализ полученных данных показал, что в летний и зимний периоды активность КФ и ЩФ у самцов и самок значимо не различается. Значимые различия активности АТФазы у самцов и самок наблюдались только летом ($P < 0,01$), а зимой различия нивелировались. Активность КФ у самцов в летний период несколько больше, чем зимой, однако эти различия не значимы. По другим показателям, характеризующим энзиматическую активность слюнных желез самцов, также не выявлено значимых сезонных различий, ибо все усредненные показатели находились в пределах статистической ошибки. У самок сезонная изменчивость проявилась в большей степени, чем у самцов. Так, активность КФ у самок летом на 1,4 балла была выше, чем зимой ($P < 0,01$), активность же АТФазы достигла максимума в декабре, превышая значение показателя в июле на 0,8 балла ($P < 0,01$). Исходя из этих данных, можно кон-

Таблица 1

Визуальная модель активности ферментов в клетке, сопряженная с различным представлением гистоэнзиматической активности

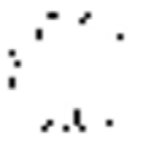
Характер выражения ферментной активности	Степень гистоэнзиматической активности					
						
Визуальное отображение ферментной активности						
Словесное выражение ферментной активности	Следы или отсутствие активности	Неотчетливая активность	Низкая активность	Умеренная активность	Средняя активность	Высокая активность
Знаковое выражение ферментной активности (стандартное обозначение)	«—»	«-(+)»	«(+)-»	«+»	«++»	«+++»
Буквенно-цифровое выражение ферментной активности [2]	«0»	«1»	«Г»	«В»	«Б»	«А»
Балльное выражение ферментной активности	«0»	«1»	«2»	«3»	«4»	«5»

Таблица 2
Результаты полуколичественного анализа гистоэнзиматической активности трех видов фосфатаз в сальных железах конетагской полевки *Microtus socialis paradoxus*

Сезон	Местоположение сальных желез	Ферменты											
		Кислая фосфатаза				Щелочная фосфатаза				Аденозинтрифосфатаза			
		Стандартное обозначение активности		КOA, баллы		Индексы, %		Стандартное обозначение активности		КOA, баллы		Индексы, %	
		♂	♀	♂	♀	$K_{\delta-\delta}$	$K_{\delta-\delta}$	♂	♀	♂	♀	$K_{\delta-\delta}$	$K_{\delta-\delta}$
		$K_{\delta-\delta}$		$K_{\delta-\delta}$		$K_{\delta-\delta}$		$K_{\delta-\delta}$		$K_{\delta-\delta}$		$K_{\delta-\delta}$	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Лето (июль)	Загринок	+++	+++	5	5	100	100	++	++	4	4	80	60
	Веки	+++	+++	5	5	100	100	++	++	4	4	80	60
	Углы рта	+++	+++	5	5	100	100	+++	+++	5	5	100	60
	Анальная область	+++	+++	5	5	100	100	+++	+++	4	5	80	60
	Подолы	++	+++	4	5	80	100	+	++	3	4	60	80
Зима (декабрь)	Усредненная активность по всем железам ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)	—	—	4,80±0,20	5,00±0,00	96	100	—	—	4,0±0,4	4,40±0,30	80	88
	Загринок	++	++	4	4	80	80	++	++	4	4	80	80
	Веки	++	++	4	4	80	80	+++	++	5	4	100	80
	Углы рта	+++	++	5	4	100	80	++	++	4	4	80	80
	Анальная область	++	++	4	4	80	80	+	++	3	4	60	80
	Подолы	+	+	3	2	60	40	+	++	3	4	60	80
	Усредненная активность по всем железам ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)	—	—	4,0±0,4	3,6±0,5	80	72	—	—	4,0±0,4	4,20±0,20	76	84

Примечание. KOA — квалитетическое обозначение активности: ♂ — самцы; ♀ — самки.

статировать отчетливую сезонную динамику ферментной активности.

На следующем этапе была выявлена относительная активность ферментов, а также определена степень полового диморфизма по этому признаку с учетом сезонных и половых различий (см. табл. 2). В целом, индекс ферментной активности в летний период был существенно больше, чем в зимний период, практически по всем видам фосфатаз. Исключение составлял минимальный показатель активности АТФазы, характерный для самок в летний период. Максимальной же активностью характеризовалась КФ у самок летом.

У самцов индекс ферментной активности КФ летом был больше, чем зимой, на 16%. У самок этот показатель зимой — меньше, чем летом, при этом разница составила 28%.

У самцов индекс ферментной активности ЩФ летом лишь на 4% превышал зимний показатель. Такие же различия в зависимости от сезона, но с несколько большими индексами ферментной активности, имели и самки.

У самцов показатели активности АТФазы в июле были несколько выше, чем в декабре, однако у самок наблюдалась противоположная картина — летом значения активности были на 16% меньше, чем зимой. Из табл. 2 видно, что половой диморфизм по активности КФ больше летом,

чем зимой, однако его степень в обоих сезонах невелика. Индекс полового диморфизма по ЩФ летом был в 2 раза меньше, чем зимой, однако его фактические значения также невелики. Максимальный половой диморфизм наблюдался в активности АТФазы в летний период, при этом зимой он сильно снижался (с 27 до 4%).

Результаты дисперсионного анализа данных представлены в табл. 3. На рисунке, дополняющем дисперсионный анализ, данные приведены с учетом изоляции одного из факторов, что позволяет выявить дифференцированное влияние либо пола, либо сезонных изменений. Результаты подтверждают ранее высказанную мысль о существовании динамики гистоэнзиматической активности.

Обсуждение полученных данных. Полученные результаты целесообразно сопоставить с образом жизни копетдагской полевки (см. табл. 2). Так, в зимний период у этих животных уровень ферментной активности в железах снижается, в весенне-летний период повышается, что связано с увеличением половой активности, размножением и выращиванием потомства, так как возрастает необходимость в информативном мечении. В этой связи функциональное значение сезонных различий в ферментной активности специфических кожных желез полевки объяснимо с позиций их участия в маркировочном поведении и передаче информации о физиологическом состоянии особи. Полагаем, что гистохимическая пластичность является частью общего приспособительного механизма к климатическим условиям среды.

Оценка влияния конкретного фактора на характер изменчивости гистохимической активности (см. табл. 3) показывает, что активность КФ в большей степени испытывает влияние сезонных климатических колебаний, влияния пола при этом не обнаружено. Изменчивость же ЩФ и АТФазы в большей степени связана с половой активностью. Только активность АТФазы подвержена весьма существенному совместному влиянию двух изученных факторов. Тем не менее, во всех случаях влияние неучтенных факторов на гистоэнзиматическую активность превалировало (особенно для ЩФ), что дает основание для проведения дальнейших исследований с целью расширения физиологического факторного поля, детерминирующего гистоэнзиматическую активность кожных желез. Полагаем, что к категории «неучтенные факторы» можно отнести географическую изменчивость, которая существенным образом ока-

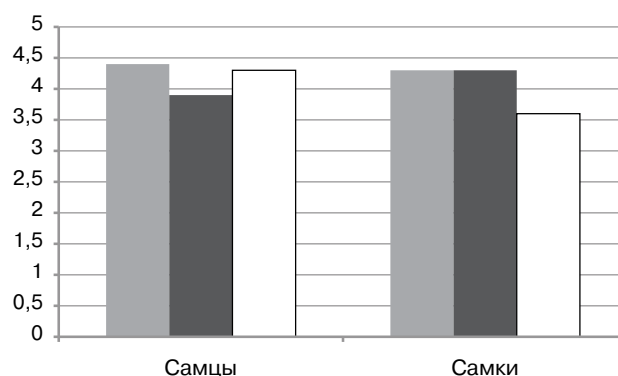


Рис. 1. Влияние половой изменчивости на активность трех видов фосфатаз слюнных желез полевки *Microtus socialis paradoxus*, исключая сезонную изменчивость. Здесь и на рис. 2: серые столбики — кислая фосфатаза; темные столбики — щелочная фосфатаза; светлые столбики — аденозинтрифосфатаза; по оси ординат — активность ферментов (баллы).

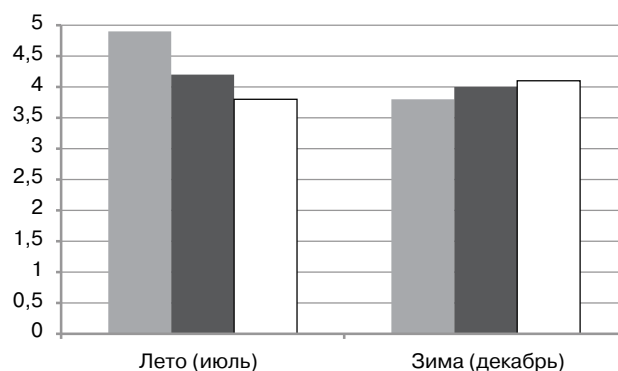


Рис. 2. Влияние сезонной изменчивости на активность трех видов фосфатаз слюнных желез полевки *Microtus socialis paradoxus*, исключая половую изменчивость.

Таблица 3

Влияние сезонной и половой изменчивости на активность трех видов фосфатаз в слюнных железах копетдагской полевки *Microtus socialis paradoxus* (%)

Виды фосфатаз	Сезонная изменчивость	Половая изменчивость	Совместное влияние сезонной и половой изменчивости	Неучтенные факторы
Кислая фосфатаза	48,21	0,40*	3,58*	47,81
Щелочная фосфатаза	2,56*	10,26*	0,00*	87,18
Аденозинтрифосфатаза	6,47	35,25	17,99	40,29

* Факторы, не оказывающие значимого влияния на гистоэнзиматическую активность ферментов кожных желез.

зывает влияние на конституционные и интерьерные показатели животных, однако данный аспект в наших исследованиях не учитывался.

Сравнивая полученные результаты с гистохимическими показателями представителей группы общественной полевки *Microtus (Sumeriomys) socialis*, становится очевидным, что ферментная активность сальных желез копетдагской полевки близка по своим параметрам к таковой у общественной полевки *Microtus socialis socialis* Pallas, 1773, что позволяет говорить об их близком родстве [3].

Таким образом, выявленные гистохимические различия сезонно-полового характера могут способствовать уточнению таксономического статуса копетдагской полевки, так как они проявляют видоспецифические черты [3, 4].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ № НШ-2210.2008.4.

ЛИТЕРАТУРА

- Берстон М. Гистохимия ферментов. М., Мир, 1965.
- Гайер Г. Электронная гистохимия. М., Мир, 1974.
- Джемухадзе Н.К. О степени родства подвидов таксономической группы общественной полевки *Microtus (Sumeriomys) socialis*. Докл. РАН, 2001, т. 377, № 2, с. 283–285.
- Джемухадзе Н.К. Сезонная изменчивость гистохимических характеристик кожных желез полевки *Microtus socialis paradoxus* и их значение в оценке таксономического статуса. Докл. РАН, 2003, т. 391, № 5, с. 712–714.
- Джемухадзе Н.К. и Киладзе А.Б. Корреляция активности некоторых фосфатаз в среднебрюшной железе и неспецифических сальных железах загрызка на примере хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*). Докл. РАН, 2008, т. 423, № 5, с. 704–706.
- Киладзе А.Б. и Джемухадзе Н.К. Квалиметрический анализ активности фосфатаз подошвенных желез серых полевок. В кн.: Тезисы IV Всероссийской конференции по поведению животных. М., Товарищество научных изданий КМК, 2007, с. 66–67.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М., Высш. школа, 1990.
- Луппа Х. Основы гистохимии. М., Мир, 1980.
- Микроскопическая техника: Руководство. Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. М., Медицина, 1996.

Поступила в редакцию 17.10.08
Получена после доработки 17.09.09

ANALYSIS OF THE HISTOENZYMATIC ACTIVITY OF THE SEBACEOUS GLANDS OF THE KOPETDAG PINE VOLE

A.B. Kiladze and N.K. Dzhemukhadze

This work presents the results of the semi-quantitative evaluation of histochemical phosphatase activity in the sebaceous glands of the Kopetdag pine vole (*Microtus socialis paradoxus* Ognev et Heptner, 1928). The studies included the conversion of standard histochemical designations of enzymatic activity into digital analogues, allowing to evaluate the level of enzymatic activity and sexual dimorphism. In male voles, the index of the acid phosphatase enzymatic activity was 16% higher in summer than in winter. This index in female voles was less in winter than in summer by 28%. The index of the alkaline phosphatase enzymatic activity in male voles in summer higher than in winter by 4%. Female voles had the same seasonal differences. Male voles had higher July adenosine triphosphatase activity indexes in comparison with December indexes, but in females this situation was the opposite — summer values of activity were 16% less than winter values. Sexual dimorphism of acid phosphatase activity was greater in summer than in winter. Index of sexual dimorphism of alkaline phosphatase activity was twice less in summer than in winter, but their actual values were small. Maximum sexual dimorphism was observed in adenosine triphosphatase activity of during summer period, and it was greatly reduced in winter (from 27.0 to 4.0%).

Key words: *sebaceous glands, phosphatases, histochemical demonstration, semi-quantitative analysis, Kopetdag pine vole (Microtus socialis paradoxus).*

Laboratory of Morphological Adaptations of the Mammals, RAS A.N. Severtzov Institute of the Problems of Ecology and Evolution, Moscow