

УДК 599.323.4: 591.141

UDC 599.323.4: 591.141

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ В МУСКУСНЫХ ПРЕПУЦИАЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗАХ САМЦОВ ОНДАТРЫ НА ЭТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

HISTOLOGICAL CHANGES AND ALBUMINOUS COMPONENTS CONTENT IN MUSKY PREPUTIAL GLANDS OF MUSKRAT MALES IN POSTNATAL ONTOGENESIS

Силкин Иван Иванович
к.б.н., доцент

Silkin Ivan Ivanovich
Cand.Biol.Sci., associate professor

Попов Александр Петрович
д.в.н., профессор
ФГБОУ ВПО Иркутская государственная сельскохозяйственная академия, Иркутск, Россия

Popov Aleksandr Petrovich
Dr.Sci.Vet., professor
Irkutsk State Academy of Agriculture, Irkutsk, Russia

Методами классической гистологии и современной гистохимии в дифференциальной оценке различных белковых компонентов выявлен ряд новых закономерностей возрастной динамики и распределении некоторых белковых веществ в клетках и тканях мускусной препуциальной железы самцов ондатры обитающих в условиях экосистемы Байкальского региона

By the methods of classical histology and modern histochemistry in differential assessment of various albuminous components, we have revealed a number of new regularities of age dynamics and distribution of some albumen in cells and tissues of musky preputial glands of muskrat males inhabiting under conditions of Baikal region ecosystem

Ключевые слова: МУСКУСНЫЕ ПРЕПУЦИАЛЬНЫЕ ЖЕЛЕЗЫ, САМЦЫ ОНДАТРЫ, ОБЩИЙ БЕЛОК, СВОБОДНЫЙ КАТИОННЫЙ БЕЛОК, РНК, ДНК, ЛИЗИН, ГИСТИДИН, АРГИНИН

Keywords: MUSKY PREPUTIAL GLANDS, MUSKRAT MALES, GENERAL PROTEIN, FREE CATION PROTEIN, RNA, DNA, LYSINE, HISTIDINE, ARGININE

Введение. Специфические кожные железы имеются у представителей всех отрядов Млекопитающих. Они отличаются крайним разнообразием локализации, степени распространенности и строения. Сальные, апокриновые и эккриновые железы входят в состав специфических кожных желез филогенетически отдаленных таксонов – от Однопроходных до Приматов [7].

Различные железы заполняют собой всю кожу млекопитающего, от кончика хвоста до морды и концов конечностей. Особый интерес представляет концентрация кожных желез в кожные органы, хорошо ограниченные и, в большинстве случаев, видимые невооруженным глазом. Почти все подобные органы являются пахучими. Они наиболее многочисленны и разнообразны в коже головы и ано-генитальной области [8, с. 9-11].

К таким железам относятся мускусные препуциальные железы ондатры. При рассмотрении доступных нам литературных источников было установлено, что мускусные препуциальные железы ондатры в структурно-функциональном аспекте были изучены только у взрослых животных [6, с. 79-92]. Вопросы, касающиеся закономерности их морфофункционального развития в онтогенезе, а особенно в раннем постнатальном онтогенезе не получили должного освещения. Учитывая очевидную значимость мускусной железы для репродукции ондатры, это послужило основанием проследить процессы становления данного органа в период постнатального онтогенеза с учетом гистологических и гистохимических особенностей, а также характерных для ондатры, обитающей в условиях экосистемы Байкальского региона. Данное сообщение является фрагментом этих комплексных исследований. Считаем, что материалы наших исследований будут служить основой для конкретизации дальнейших исследований экологии, морфологии и биологии ондатры, а также способствовать разработке региональных ландшафтно-географических принципов рационального использования ресурсов вида.

Материал и методы исследования. Объектом исследования являлась мускусная препуциальная железа самцов ондатры (*Ondatra zibethicus*). Материал собирали в период полевых экспедиций весной-осенью 2007 года от условно здоровых особей в Иркутском районе Иркутской области по берегам Иркутского водохранилища и в районе дельты реки Селенги Кабанского района Республики Бурятия. Нами была исследована мускусная препуциальная железа от животных семи, функционально обоснованных, возрастных групп постнатального периода развития: новорожденных, 1-; 3-; 5-; 8-; 10 и 12 месячного возраста. Для этого подбирались животные по типу аналогов с учетом пола, возраста и физиологического состояния. Возраст определяли при помощи

соответствующих методик [1, с. 37-40]. Количество исследованных животных в каждой группе составляло 5 особей.

В качестве фиксатора для гистологических исследований и на выявление белковых компонентов применяли 10% нейтральный формалин и жидкость Карнуа с последующей заливкой в парафин. Серийные парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм изготавливали на микротоме «С. Reichert wien». Гистологические препараты изучали при помощи микроскопа «Motic BA 400 T».

Срезы для морфологических исследований окрашивали гематоксилин-эозином по Караччи и по методу ван Гизон [3, с. 167-169]. Функциональную активность клеточных ядер тиреоидного эпителия выявляли методом А.Н. Яцковского [9, с. 76-79]. Ядра, окрашивающиеся, альциановым синим при рН-4,8 и водным раствором сафранина в равных соотношениях с резорцином в синий или сине-красный цвет, считали активными (содержат эухроматин). Неактивные ядра окрашивались в красный (содержат гетерохроматин).

Для выявления общего белка использовали метод тетразониевого азосочетания по Даниелли с применением прочного синего Б по Берстону [11, Р. 243-259] в нашей модификации [5, с. 68-69], где взамен труднодоступного веронала (барбитала) мы использовали глицин-гидроокись натрия [2, с. 265]. Бромфеноловый синий применяли для обнаружения суммарного (при рН-2,2) и свободного катионного (при рН-8,2) белков [11, Р. 243-259]. При выявлении последнего гистопрепараты предварительно обрабатывали 3%-ным раствором трихлоруксусной кислоты при $t\ 90^{\circ}\text{C}$ с целью удаления нуклеиновых кислот и освобождения связанных с ними белков типа гистонов. РНК выявляли по методу Браше в модификации N.B. Kurnick [10, Р. 221-268] с постановкой контроля рибонуклеазой в концентрации 1мг/мл на физиологическом растворе в течение 1 часа при $t\ 37^{\circ}\text{C}$. За РНК принимали вещества, проявляющие

пиронинофилию, ферментирующиеся рибонуклеазой. ДНК идентифицировали стандартной реакцией Фельгена. Взамен трудно доступных М-проционовых красителей для выявления аминокислот лизина и гистидина мы использовали остазиновые красители (остазин – С-6Г), рекомендованные в гистохимическую практику А.П. Поповым [4, с. 36-38]. Для обнаружения аргинина использовали качественную реакцию с 8-оксихинолином-гипохлорита [3, с. 239]. Идентификацию лизина, гистидина и аргинина проводили дезаминированием в свежеприготовленной смеси равных объемов 5%-ного раствора нитрита натрия и 10%-ного раствора уксусной кислоты при $t +4^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Дезаминирование блокирует лизин, сохраняя окрашивание гистидина и аргинина.

Результаты исследований. Мускусная препуциальная железа *новорожденных самцов ондатры* имеет дефинитивное строение. Орган покрыт мощной соединительнотканной капсулой, от которой внутрь органа отходят прослойки делящие железу на доли. В капсуле встречаются кровеносные сосуды, жировые клетки. Строма существенно преобладает над паренхимой. Паренхима органа представлена многочисленными железистыми клубочками, отделенными друг от друга тонкими прослойками соединительной ткани. Железистые клубочки представлены гиперхромными округлыми клетками, в разной степени воспринимающие окраску. Одни клетки более светлые, другие темные. Причем более светлые клетки лежат в центре клубочка, а более темные расположены по периферии. Выводной проток железы простой, состоит из многослойного кубического эпителия. По строению мускусная препуциальная железа *новорожденных самцов ондатры* напоминает простую альвеолярную железу с разветвленными концевыми отделами. При окраске по методу Яцковского установлено, что ядра клеток в основном неактивные – содержат гетерохроматин.

У новорожденных щенков самцов ондатры вещества, проявляющие пиронинофилию в виде интенсивной ярко-красной окраски, выявляются в секреторных клетках железы. Наиболее ярко, в красно-лиловый цвет, окрашивается капсула органа и оболочка кровеносных сосудов. При контроле с рибонуклеазой эти вещества не идентифицировались в секреторных отделах железы и в соединительной капсуле. Это обстоятельство позволяет предположить об отсутствии запасов РНК в мускусной препуциальной железе ондатры на ранних этапах постнатального онтогенеза. Стандартная реакция Фельгена позволяет отличить в структурах железы ДНК. Интенсивная реакция в виде яркого красно-лилового окрашивания выявила существенное содержание этого компонента в цитоплазме и ядрах glanduloцитов секреторных отделов находящихся на периферии органа, межуточной соединительной ткани и наружной капсуле мускусной препуциальной железы. Умеренная реакция в секреторных отделах расположенных ближе к центру органа. Общий белок проявляет себя в виде ярко-синей окраски в соединительнотканых прослойках железы и наружной капсуле. В цитоплазме и ядрах glanduloцитов реакция менее интенсивная. Лизин и гистидин проявляют ярко-желтое окрашивание в наружной капсуле, умеренно окрашиваются в ядрах glanduloцитов, а в цитоплазме последних дают бледно-желтый цвет. После дезаминирования интенсивность окраски заметно меняется: в цитоплазме и ядрах glanduloцитов она бледная и умеренная в наружной капсуле. Качественные реакции на свободный катионный белок и аргинин дали отрицательный результат.

В 1 месяц постнатального развития у самцов ондатры в мускусной препуциальной железе отмечаются процессы роста органа. Железистые клубочки разрастаются, объединяются в пакеты, отделенные друг от друга прослойками соединительной ткани. В свою очередь в пакетах содержатся клубочки ограниченные внутри него друг от друга также прослойками

соединительной ткани. Ядра клеток по-прежнему в большинстве своем содержат гетерохроматин.

Характерной особенностью является появление в структурах железы РНК. В виде умеренной красной окраски этот компонент проявляет себя в соединительнотканых прослойках железы и наружной капсуле. Слабая реакция отмечена в цитоплазме glanduloцитов. Усилилась интенсивность реакции на общий белок в цитоплазме и ядрах glanduloцитов. На прежнем уровне осталось содержание ДНК, лизина и гистидина. Аргинин и свободный катионный белок по-прежнему не выявляется.

В *3-месячном возрасте* происходит плавное увеличение объема органа. Паренхима преобладает над стромой. Морфологически существенных отличий от предыдущих периодов не отмечается. Большинство ядер клеток неактивные и только у одного из пяти отмечено преобладание синих ядер.

Отмечается увеличение содержания РНК в цитоплазме glanduloцитов. В виде интенсивной алой окраски она выявляется в секреторных клетках железы. В соединительнотканых прослойках и наружной капсуле по сравнению с предыдущим возрастом её содержание не изменилось. В ядрах glanduloцитов и соединительной ткани железы отмечено также увеличение содержания ДНК. Увеличение содержания количества общего белка обнаруживается в цитоплазме и ядрах glanduloцитов, а в наружной капсуле органа наоборот отмечено его уменьшение по сравнению с предыдущими периодами. Причем в ядрах секреторных клеток железы его количество больше чем в цитоплазме. Реакция на гистидин усилилась в ядрах glanduloцитов и снизилась в наружной капсуле. Аргинин и свободный катионный белок, как и у 1 месячных животных не выявляется.

У *5-месячных самцов* ондатры в мускусной препуциальной железе продолжают активные процессы роста органа. Это характеризуется

резким увеличением объема органа, количества выводных протоков и удельного процентного соотношения паренхимы по отношению к строме. В гистологическом отношении морфологических отличий в структурных элементах железы по сравнению с предыдущими периодами не выявлено. Отмечается преобладание клеток содержащих эухроматин, причем в основном эти клетки содержатся в базальном слое концевых отделов железы.

Гистохимической особенностью 5-месячного возраста является снижение уровня содержания РНК, который обнаруживается в виде равномерной бледно-розовой окраски в железистых структурных элементах железы. В соединительнотканых прослойках и наружной капсуле характерно равномерное умеренное розовое окрашивание РНК. ДНК полностью отсутствует в соединительной ткани железы, а в цитоплазме и ядрах glanduloцитов отмечено снижение количества этого компонента по сравнению с предыдущим периодом. Содержание общего белка в этом возрасте снижается в цитоплазме и ядрах glanduloцитов. В наружной капсуле количество этого компонента остается без изменений. Происходит увеличение содержания лизина и гистидина во всех структурных компонентах железы по сравнению с предыдущими периодами. Полным отсутствием аргинина и свободного катионного белка характеризуется этот возрастной период.

В 8-месячном возрасте происходит существенное увеличение объема железы и преобладание железистой паренхимы над соединительнотканной стромой. Диаметр просвета выводных протоков сильно увеличивается. Выводной проток не содержит секрета, состоит из сильно уплощенного многослойного плоского эпителия, окруженного соединительной тканью. Концевые отделы образованы несколькими альвеолами похожими на мешочки ацинарной формы, состоящими из многослойного эпителия, в котором имеются клетки двух типов. Первый

тип – это клетки лежащие на базальной мембране и образующие периферический слой – мелкие, базофильные, делящиеся митотически, после чего они выталкиваются из этого слоя и видоизменяются. Второй тип – это крупные, полигональные клетки, накапливающиеся в мешочке и смещающиеся в направлении выводного протока. Морфология клеток и особенности их митоза, а также строение выводных протоков очень напоминают структуру сальных желез. Отсюда можно сделать вывод, что мускусные препуциальные железы самцов ондатры в 8 месячном возрасте, а в условиях Байкальского региона это начало полового созревания у самцов ондатры, по своему гистологическому строению относятся к сальным железам. Результаты окраски по методу Яцковского свидетельствуют о повышении в концевых отделах железы в данный возрастной период числа клеток с синтетически активными ядрами.

РНК полностью отсутствует в железистых структурных элементах железы. Слабая реакция на этот компонент отмечена в наружной капсуле. ДНК в этом возрасте не идентифицируется. Характерной особенностью этого возраста является появление местами аргинина в ядрах glanduloцитов железы. Количество лизина уменьшается, а гистидин полностью отсутствует в железистых структурах органа. В соединительно-тканной капсуле отмечена слабая реакция на гистидин. Интенсивность же реакции на лизин не изменяется по сравнению с предыдущим возрастом. Слабая реакция на общий белок отмечена во всех структурных компонентах железы. Свободный катионный белок не выявляется.

В *10-12 месячном возрасте* эпителий выводного протока настолько сильно уплотняется, что его клетки по форме становятся похожи на соединительнотканые клетки. Количество крупных, округлых клеток увеличивается, их количество становится максимальным ближе к протоку, что приводит к дегенерации клеток, которые входят в состав секрета. Из всего этого можно сделать вывод, что начало активной секреции

мускусной препуциальной железы самцов ондатры обитающей в условиях экосистемы Байкальского региона наступает в *10 месячном возрасте*, что совпадает с их половой зрелостью. Железа секретирует по голокриновому типу, при котором потеря клеток при секреции восполняется активным размножением клеток базального слоя концевой отдела. Практически все ядра клеток в этом возрасте содержат эухроматин.

В гистохимическом выражении усиливается реакция на аргинин в ядрах эпителиальных клеток железы. Распределение этого компонента равномерное по сравнению с предыдущим возрастом. Содержание и распределение других исследуемых компонентов в структурных элементах мускусной препуциальной железы по сравнению с предыдущим периодом не изменяется. Свободный катионный белок также не выявляется.

Выводы. Таким образом, нами с применением классических гистологических и современных гистохимических методов исследования изучена гистоморфология и проведен анализ динамики содержания белковых соединений в мускусной препуциальной железе самцов ондатры на этапах постнатального онтогенеза. Проведенные нами исследования позволяют сделать следующие выводы.

С рождения у самцов ондатры мускусная препуциальная железа имеет дефинитивное строение. По строению это простая альвеолярная железа. Паренхима органа представлена многочисленными железистыми клубочками, отделенными друг от друга тонкими прослойками соединительной ткани. Клеточный состав органа представлен двумя типами (светлыми и темными) гиперхромных клеток. В дальнейшем к 1 месячному возрасту, железистые клубочки объединяются в пакеты и трансформируются к 8 месячному периоду развития в мешочки ацинарной формы. В 8 месяцев начинается секреторная функция железы и по своей гистологической структуре она становится похожа на сальную железу. В 10-12 месячном возрасте мускусная препуциальная железа самцов

ондатры активно функционирует по голокриновому типу секреции. Функциональная активность мускусной препуциальной железы напрямую зависит от половой функции самцов ондатры.

С рождения у самцов ондатры в секреторных клетках железы не выявляется РНК. Этот компонент появляется в 1 месячном возрасте, постепенно накапливаясь до 3 месячного возраста. Начиная с 5 месяцев постнатального онтогенеза, его количество уменьшается, полностью расходуясь в секреторных клетках железы в 8 месяцев. Расход РНК выше в паренхиме мускусной препуциальной железы, в соединительно-тканых прослойках и наружной капсуле органа РНК в незначительном количестве сохраняется до 10-12 месяцев.

ДНК у новорожденных щенков ондатры в значительном количестве выявляется в цитоплазме и ядрах glanduloцитов секреторных отделов находящихся на периферии органа, межуточной соединительной ткани и наружной капсуле мускусной препуциальной железы. Затем в 3 месячном возрасте происходит увеличение содержания этого компонента, снижение его содержания в 5 месяцев и полное его использование в 8 месячном возрасте. Вплоть до 12 месячного возраста ДНК не выявляется.

Лизин и гистидин на раннем этапе постнатального онтогенеза проявляют ярко-желтое окрашивание в наружной капсуле, умеренно окрашиваются в ядрах glanduloцитов, а в цитоплазме последних дают бледно-желтый цвет. После дезаминирования интенсивность окраски заметно меняется: в цитоплазме и ядрах glanduloцитов она бледная и умеренная в наружной капсуле. В 3 месячном возрасте реакция на гистидин усиливается в ядрах glanduloцитов и снижается в наружной капсуле. В 5 месячном возрасте происходит увеличение содержания обоих компонентов, затем количество лизина уменьшается в железистых структурах железы, а гистидин полностью расходуется в 8 месяцев,

проявляя себя в незначительном количестве в наружной капсуле. Причем такое состояние сохраняется до 10-12 месячного возраста.

Общий белок с рождения в значительном количестве содержится в соединительно-тканых прослойках и наружной капсуле железы. В цитоплазме и ядрах glanduloцитов его содержание несколько меньше. Начиная с 1 месячного возраста, содержание этого компонента в цитоплазме и ядрах glanduloцитов увеличивается, а в соединительно-тканых прослойках и наружной капсуле в 3 месяцев уменьшается. С 5 до 10-12 месячного возраста происходит расщепление этого компонента во всех структурных компонентах мускусовой препуциальной железы.

В 8 месячном возрасте в ядрах glanduloцитов мускусовой препуциальной железы появляется аргинин. Он выявляется местами, равномерно распределяясь к 10-12 месячному возрасту.

Свободный катионный белок не обнаруживается в тканях мускусовой препуциальной железы в исследуемые периоды постнатального развития самцов ондатры.

Уровень физиологических процессов изучаемого органа на различных стадиях постнатального развития является видовой особенностью данного млекопитающего.

Литература

1. Водопьянов Б.Г. Определение возраста и пола охотничьих зверей: уч. пособие по биотехнии / Б.Г. Водопьянов, В.О. Саловаров. – Иркутск: Изд-во ИрГСХА, 2001. С. 37-40.
2. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – С. 265
3. Лилли Р.Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р.Д. Лили. – М.: Мир, 1969. – 624 с.
4. Попов А.П. К вопросу о применении дихлортриазиновых красителей в гистохимии / А.П. Попов // Исслед. по морфологии и физиологии с.-х. животных. – Благовещенск, 1981. – С. 36-38.
5. Силкин И.И. Модификация метода тетразониевого азосочетания (по Даниелли) с использованием прочного синего Б (по Берстону) / И.И. Силкин, Б.Я. Власов // Вестник Полтавской гос. аграрной акад. – 2009. – № 2 (53). С. – 68-69.

6. Соколов В.Е. Ондатра. Морфология, систематика, экология / В.Е. Соколов, В.Н. Большаков, Р.С. Вольскис, И.М. Громов и др. – М.: Наука, 1993. – 542 с.
7. Соколов В.Е. Кожные железы млекопитающих / В.Е. Соколов, О.Ф. Чернова. – М.: ГЕОС. – 648 с.
8. Шабдаш С.А. Гепатоидные кожные железы млекопитающих / С.А. Шабдаш, О.Ф. Чернова. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 217 с.
9. Яцковский А. Н. Метод оценки функциональной активности клеточных ядер / А. Н. Яцковский // *Арх. анат.* – 1987. – Т. 92. – Вып. 1. – С. 76-79.
10. Kurnick N.B. Histochemistry of nucleic acids / N.B. Kurnick // *Int. Rev. Cytol.* – 1955. – № 4. – P. 221-268.
11. Ringerts N. Cytochemical demonstration of histones and protamines. Mechanism and specificity of the alkaline bromphenol blue binding reaction / N. Ringerts, A. Zetterberg // *Exp.Cell. Res.* – 1966 – V. 42. – N 2. – P. 243-259.