

УДК [577.151+591.8] 595.771

©1997г. В.Я. ДВОРНИК, З.В. УСОВА

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ
НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФОСФАТАЗ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ МОШКИ WILHELMIA SALOPIENSIS
EDW. (DIPTERA: SIMULIIDAE) В ПРЕИМАГИНАЛЬНЫХ ФАЗАХ РАЗВИТИЯ. СООБЩЕНИЕ I.
ПИЩЕВАРИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА И СЛЮННЫЕ ЖЕЛЕЗЫ**

Введение.

Неспецифические фосфатазы - щелочная (КФ 3.1.3.1) и кислая (КФ 3.1.3.2), являются одними из наиболее распространенных и изученных ферментов насекомых. Количество опубликованных работ, посвященных рассмотрению свойств этих ферментов и их роли в онтогенезе насекомых, очень велико, и их более-менее основательный обзор дан нами ранее (Дворник, 1990). Здесь, однако, следует отметить, что работы по неспецифическим фосфатазам мошек весьма немногочисленны. Большая их часть посвящена изучению этих ферментов электрофоретическими методами без выяснения роли фосфатаз в онтогенезе (см., например, Coker, 1973; May et al., 1977; Rivoecchi et al., 1984). Более пристальное внимание было уделено этим вопросам в наших ранних работах (Дворник, 1992а,б). Настоящая серия сообщений более подробно представляет данные об активности фосфатаз в различных органах и тканях мошек *Wilhelmia salopiensis* Edw. в процессе развития личинок и куколок и рассматривает в связи с этим возможную физиологическую роль этих ферментов.

Материал и методы.

Гистохимическое выявление ферментов проводили: у незрелых личинок трех возрастов, зрелых личинок, или предкуколок (с темными проторакальными дисками), 1-, 2-, 3-дневных и фататных куколок. Возраст личинок определяли по методике А.Е.Тартарян (1957). В опытах использовали как самцов, так и самок. Самцов и самок определяли: на фазе личинки — по зачаткам половых желез, на фазе куколки — по строению лба и сложных глаз.

Насекомых фиксировали в кальций-формоле по Бейкеру в течение 18 ч при +4°C, затем промывали в двух сменах водопроводной воды в течение 18 - 24 ч при той же температуре и заливали в 12% желатин (16 ч при +37°C). Для уплотнения залитый в желатин материал выдерживали в холодильнике в течение 1 - 2 суток. Криостатные срезы толщиной 10 мкм накладывали без применения белка с глицерином на обезжиренные предметные стекла и хорошо высушивали. Желатин затем удаляли из срезов теплой (+37°C) дистиллированной водой и срезы подвергали инкубированию в среде для выявления активности ферментов.

Гистохимическое определение кислой фосфатазы в тканях и органах мошек проводили методом азосочетания со стабильными солями диазония в собственной модификации. Вместо рекомендуемых в качестве субстрата 1-нафтилфосфата и фосфорных эфиров сложных нафтолов (Берстон, 1965; Лилли, 1969; Лойда и др., 1982) использовали 2-нафтилфосфат как обеспечивавший более точную локализацию мест активности фермента.

В окончательном варианте среду для выявления кислой фосфатазы готовили, последовательно растворяя в требуемом объеме ацетатного буфера, приготовленного титрованием 2,5% раствора ацетата 0,1 М уксусной кислотой до pH 6,0, 2-нафтилфосфат натрия из расчета 0,5 мг/мл и прочный синий RR (1,5 мг/мл). Среду отфильтровывали непосредственно на срезы. Контрольные срезы обрабатывали в течение 10 мин 0,042% раствором фторида натрия.

Инкубацию проводили при +37°C в течение 40 мин.

Гистохимическое определение щелочной фосфатазы проводили методом азосочетания по Пирсу (Лойда и др., 1982) в нашей модификации, как указано выше (вместо 1-нафтилфосфата использовали 2-нафтилфосфат). Срезы инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Контрольные срезы обрабатывали в течение 10 мин 0,01 М раствором L-цистеина, а затем выдерживали в среде, содержащей ингибитор в той же концентрации.

Количественный гистохимический анализ активности ферментов. Для измерения активности ферментов нами был применен цитофотометрический метод, основанный на законе Ламберта-Бэра. Согласно этому закону, слой гомогенной поглощающей среды равной толщины

поглощают равное количество света. Таким образом, измеряя оптическую плотность продукта гистохимической реакции, мы можем судить об активности фермента *in situ*.

Измерение оптической плотности препаратов осуществляли на микроцитофотометре ЛЮМАМ ПМ-11 в полихроматическом свете при увеличении в 350 раз и зонде диаметром 1 мкм. Активность фермента, принятую равной плотности отложения формазана (окрашенного продукта реакции) в срезах, выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$A_{\text{отн}} = \frac{\int_{a_1}^{a_2} E dl}{I} \times 100,$$

где $\int_{a_1}^{a_2} E dl$ — площадь соответствующего участка денситограммы, I —

длина сканируемого участка под соответствующим участком денситограммы, E — экстинкция, которая вычисляется по формуле $E = \lg \Phi_0/\Phi$, где Φ_0 и Φ — соответственно падающий и прошедший через препарат световой поток. Измерение оптической плотности проводили в автоматическом режиме. Вычисление активности ферментов осуществляли при помощи оригинальных программных продуктов, любезно предоставленных ЦНИЛ Донецкого медицинского университета.

Результаты и обсуждение.

Гистохимическая локализация неспецифических фосфатаз в органах личинок мошек некоторых возрастов была описана нами ранее (Дворник, 1992а,б). Здесь лишь отметим, что в пищеварительной системе щелочная фосфатаза обнаружена у личинок всех возрастов в эпителии средней кишки и слюнных желёз, а у куколок — в дегенерирующем эпителии кишечника и слюнных желёз. Ее активность в онтогенезе преимагинальных фаз мошек изменяется. Причем, если по мере развития личинок она возрастает, достигая максимума у предкуколок, то у куколок максимальная активность щелочной фосфатазы отмечена к концу второго дня развития, а затем быстро снижается и к середине развития этой фазы исчезает (табл. 1).

Таблица 1. Активность щелочной фосфатазы (отн. ед.) в различных отделах пищеварительной системы и слюнных железах личинок и куколок мошки *W. salopiensis*.

Органы Стадии развития	Слюнные железы	Железистые выросты средней кишки	Передняя часть средней кишки	Желудок	Дегенерирующий эпителий кишки
Личинка:					
III-IV	49,48±2,16	65,01±5,29	55,92±4,37	58,92±3,90	—
IV-V	51,29±2,91	66,08±4,67	53,31±3,12	59,76±2,82	—
V-VI	51,82±3,56	67,37±3,74	46,78±4,15	47,55±4,05	—
зрелая	61,50±3,07	70,55±4,51	53,51±2,31	61,82±2,66	—
Куколка:					
0-1-дневная	45,43±2,12	—	—	—	39,41±3,58
1-2-дневная	35,15±1,73	—	—	—	43,18±4,96
2-3-дневная	—	—	—	—	27,99±3,54

Динамика активности щелочной фосфатазы в дегенерирующем эпителии кишечника и слюнных желёз на фазе куколки значительно различается. В слюнных железах активность фермента проявляется только в течение первых двух дней развития, а затем исчезает, тогда как в эпителии средней кишки сохраняется приблизительно до четвертого дня развития куколки.

Как видно из табл. 1, наивысшая активность щелочной фосфатазы обнаружена в клетках слепых выростов средней кишки. Вероятно, эти образования играют главную роль в секреции ферментов в ее полость. Щелочная фосфатаза последней трети средней кишки, или желудка, напротив, участвует в транспорте продуктов кишечного гидролиза из полости кишечника в клетки эпителия. На выполнение щелочной фосфатазой желудка именно транспортных функций указывает ее локализация исключительно в щёточной каёмке клеток кишечного эпителия (Дворник, 1992а). Эти данные согласуются с результатами исследований других авторов (Beadle, 1971; Monget, 1975; Houk et al., 1986) по другим группам насекомых.

Сравнение уровней активности щелочной фосфатазы различных отделов средней кишки личинок мошек разных возрастов показывает, что наибольшей функциональной дифференциации эти отделы достигают на стадии зрелой личинки (предкуколки).

Характер и динамика активности щелочной фосфатазы в слюнных железах личинок, очевидно, связаны с процессами их органогенеза и клеточной дифференциации, а также со специфическими функциями этих органов в фазе личинки у мошек. Как показано И.А.Рубцовым (1956), на ранних стадиях развития личинки клетки желёз еще слабо дифференцированы, за исключением клеток выводных протоков, в которых и обнаруживается данный фермент.

Увеличение активности щелочной фосфатазы в выводных протоках слюнных желез зрелых личинок связано, несомненно, с их подготовкой к метаморфозу и началом плетения кокона.

Значения активности кислой фосфатазы в различных отделах кишечника отличаются, временами существенно (табл. 2). Однако в целом, активность фермента в течение личиночной фазы растет, достигая максимума у личинок VI возраста и предкуколок. Следует отметить, что для куколок приведены средние значения активности кислой фосфатазы: в действительности максимальные значения активности в клетках различных отделов средней кишки колеблются в пределах 35 - 100 относительных единиц, особенно у 1 - 2-дневных куколок. В формирующемся имагинальном эпителии кишечника фаратных куколок активность кислой фосфатазы минимальна.

В слюнных железах кислая фосфатаза обнаружена в клетках всех отделов. Ее активность в проксимальном и дистальном отделах практически одинакова (табл. 3). В фазе куколки активность кислой фосфатазы в дегенерирующих слюнных железах личинки проявляется приблизительно до окончания второго дня развития, т.е. до завершения их лизиса.

Как известно, эпителий передней и средней кишки насекомых является производным эктодермы и во время линьки отслаивается и удаляется вместе с кутикулой. В этой связи одной из функций кислой фосфатазы этих отделов пищеварительной системы личинок мошек является, вероятно, лизис внутриклеточных структур, а также базальных мембран клеток, что облегчает процесс отторжения эпителия.

Показатели активности кислой фосфатазы в клетках средней кишки подтверждают вывод о функциональной специализации различных частей этого отдела пищеварительной системы, а также степени их дифференциации в процессе органогенеза.

Значения активности фермента в клетках кишечника свидетельствуют о том, что интенсивность процессов гидролиза кишечного содержимого, его абсорбции и внутриклеточного пищеварения возрастает по мере развития личинки, достигая максимума у предпоследнего личиночного возраста и предкуколок (табл. 2).

В фазе куколки физиологическая роль кислой фосфатазы средней кишки, несомненно, состоит в лизисе клеток эпителия. Причем значения активности фермента в различных отделах дегенерирующей средней кишки подвержены значительным колебаниям. Участки с наибольшим уровнем активности соответствуют переднему отделу средней кишки личинки и железистым выростам, а с наименьшим — среднему отделу.

Динамика активности кислой фосфатазы в слюнных железах личинок мошек служит показателем процессов дифференциации отделов этих органов. Ее значения в проксимальном (секреторном) и дистальном (накопительном) отделах у личинок младших возрастов практически равны, однако, по мере развития всё более различаются — активность фермента в дистальном отделе превышает таковую в клетках проксимального. Значительное увеличение активности кислой фосфатазы в этих органах у личинок IV - V возраста, по сравнению с личинками предыдущего возраста (табл. 3), наряду с изменениями в гистохимической локализации щелочной фосфатазы (Дворник, 1992а), даёт основание предполагать, что процесс клеточной дифференциации слюнных желёз завершается именно в течение IV - V личиночного возраста. Дальнейший рост активности ферментов у личинок последующих возрастов связан, вероятно, с

интенсификацией метаболических процессов и не является следствием каких-либо качественных изменений в органах.

Таблица 2. Активность кислой фосфатазы (отн. ед.) в различных отделах пищеварительной системы личинок и куколок мошки *W. salopiensis*.

Отделы Стадии развития	Передняя кишка	Железистые выросты средней кишки	1-я треть средней кишки	2-я треть средней кишки	Желудок	Задняя кишка	Дегенерирующий эпителий кишки
Личинка:							
III-IV	49,29±2,90	27,81±1,85	27,45±3,62	31,46±2,13	31,23±2,92	32,57±2,12	—
IV-V	48,64±2,52	29,94±1,76	42,10±3,01	38,14±1,96	52,92±2,74	30,92±2,07	—
V-VI	71,51±6,06	36,87±2,40	58,18±3,76	47,44±2,66	60,15±4,44	61,76±4,92	—
зрелая	50,11±4,62	50,18±2,94	57,02±3,74	50,91±3,37	56,14±2,84	46,29±3,69	—
Куколка:							
0-1-дневная	—	—	—	—	—	—	51,42±3,19
1-2-дневная	—	—	—	—	—	—	62,01±4,45
2-3-дневная	—	—	—	—	—	—	34,45±5,84

Таблица 3. Активность кислой фосфатазы (отн. ед.) в отделах слюнных желез личинок и куколок мошки *W. salopiensis*.

Отделы Стадии развития	Проксимальный	Дистальный
Личинка:		
III-IV	33,88±2,40	33,51±1,52
IV-V	48,71±2,53	49,10±2,31
V-VI	51,14±5,09	53,30±4,59
зрелая	62,02±3,22	68,28±4,05
Куколка:		
0-1-дневная	45,45±4,00	
1-2-дневная	40,90±5,79	
2-3-дневная	—	

Максимальная активность кислой фосфатазы в слюнных железах наблюдается, начиная с VI личиночного возраста. Вероятно, увеличению активности фермента способствует снижение титра ювенильного гормона. Однако к завершению личиночного развития и началу плетения кокона активность кислой фосфатазы в клетках слюнных желёз снижается.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что в кишечнике и слюнных железах личинок и куколок мошек неспецифические фосфатазы выполняют широкий спектр физиологических функций, непосредственно связанных с процессами органогенеза и клеточной дифференциации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 464 с.
- Дворник В.Я. Неспецифические фосфомоноэстеразы насекомых. Краткий обзор // Деп. в УкрНИИНТИ 2.11.90, № 1810-Ук90. — 21 с.
- Дворник В.Я. Локализация и активность щелочной фосфатазы у личинок и куколок кровососущих мошек *Voophthora erythrocephala* De Geer (*Diptera: Simuliidae*) // В кн.: Успехи энтомологии в СССР. Двукрылые: систематика, экология, медицинское и ветеринарное значение. — Спб, 1992а. — С. 111 - 112.
- Дворник В.Я. Гистохимическая локализация кислой фосфатазы у личинок последнего возраста мошек *Wilhelmia salopiensis* Edw. (*Diptera, Simuliidae*) // В кн.: Кровососущие и зоофильные двукрылые (*Insecta: Diptera*). — СПб, 1992б. — С. 45 - 47.
- Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. — М.: Мир, 1969. — 645 с.
- Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. — М.: Мир, 1982. — 272 с.
- Рубцов И.А. Мошки (сем. *Simuliidae*). Сер. Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Т. VI. — М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1956. - 859 с.
- Тартарян А.Е. Определение стадий у личинок мошек (*Diptera: Simuliidae*) // Энтотол. обозр. — 1957. — Т. 36. — С. 866 - 868.
- Beadle D. The localization of alkaline phosphatase in the midgut epithelium of *Carausius morosus* // Histochemie. — 1971. — V. 27. — P. 370 - 372.
- Biochemical genetic variation in the family *Simuliidae* electrophoretic identification of the human biter in the isomorphic *Simulium jenningsi* group / May B., Bauer L., Vadas R., Grannet I. // Ann. Entomol. Soc. Amer. — 1977. — V. 70. — P. 637 - 639.
- Coker W. Electrophoretic patterns in *Anopheles gambiae* and *Simulium damnosum* // Ann. Trop. Med. Parasitol. — 1973. — V. 67. — P. 475 - 481.
- Houk E., Arcus Y., Hardy J. Isolation of brush border fragments from mosquito mesenterous // Arch. Insect Biochem. Physiol. — 1986. — V. 3. — P. 135 - 146.
- Monget D. Difference d'activites enzymatiques entre deux lignees cellulaires d'insectes: *Antheraea eucalypti* et *Malacosoma disstria* (*Lepidoptera*) // C. r. Acad. sci. — 1975. — V. 281D. — P. 651 - 654.
- Rivoecchi L., Cianchi R., Bullini L. L'identificazione elettroforetica dei simuliidi del complesso *Reptans* (*Diptera, Nematocera*) nello studio degli attacchi al bestiame in val d'Alige // Ann. Inst. super. Sanita. — 1984. — V. 20. — P. 377 - 385.

Донецкий государственный университет

V.YA. DVORNIK, Z.V. USOVA

A QUANTITATIVE HISTOCHEMICAL STUDY OF ACTIVITY OF NON-SPECIFIC PHOSPHATASES OF WILHELMIA SALOPIENSIS EDW. (DIPTERA : SIMULIIDAE) INTESTINES AT PREIMAGINAL STAGES OF DEVELOPMENT. REPORT 1: DIGESTION SYSTEM AND SALIVARY GLANDS

Donetsk State University

SUMMARY

By means of quantitative histochemical technique (cytophotometry) the dynamics of non-specific phosphatases activity was determined in gut and salivary glands of larvae and pupae of a blackfly, *Wilhelmia salopiensis* Edw. The obtained data showed definitely a very important role of the enzymes in organogenesis, cellular differentiation, and metamorphosis, in particular.