

А.Б. Киладзе, Н.К. Джемухадзе

КВАЛИМЕТРИЯ В ГИСТОХИМИИ ФЕРМЕНТОВ

*(на примере кожных
желез млекопитающих)*



«Инфра-Инженерия»

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова

А.Б. Киладзе, Н.К. Джемухадзе

КВАЛИМЕТРИЯ
В ГИСТОХИМИИ
ФЕРМЕНТОВ

на примере кожных желез млекопитающих

Инфра-Инженерия
Москва
2013

УДК 611.018.72 + 611.773 + 611.774

ББК 28.6 + 30.607я73

К39

Ответственный редактор:

О.Ф. Чернова – д-р биол. наук, зав. лаб. морфологических адаптаций позвоночных Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

Рецензенты:

Г.Г. Азгальдов – д-р экон. наук, профессор, главный научный сотрудник Центрального экономико-математического института РАН;

В.В. Делекторская – д-р мед. наук, зав. лаб. гистохимии и электронной микроскопии Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН;

А.В. Суров – д-р биол. наук, зав. лаб. сравнительной этологии и биокommunikаций, зам. директора по научной работе Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

Киладзе А.Б., Джемухадзе Н.К.

К 39 Квалиметрия в гистохимии ферментов (на примере кожных желез млекопитающих). – М.: Инфра-Инженерия, 2013. – 128 с.

Илл. 26. Табл. 25. Библ. 114.

ISBN 978-5-9729-0068-8

Монография содержит введение методов квалиметрического анализа в гистоэнзиматические исследования кожных желез млекопитающих. Раскрыта сущность биоквалиметрии как науки. Обсуждается значение квалиметрии в гистохимии ферментов. Приведена биометрическая обработка цифровых аналогов гистоэнзиматической активности кожных желез млекопитающих с использованием методов дескриптивной статистики, корреляционно-регрессионного и дисперсионного анализов, а также рядов динамики. Приведены конкретные примеры использования методов биоквалиметрии и биометрии при оценке гистоэнзиматической активности кожных желез на примере грызунов и насекомыхядных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ (проект НШ-5928.2012.4).

© Киладзе А.Б., Джемухадзе Н.К., авторы, 2013

© Издательство «Инфра-Инженерия», 2013

ISBN 978-5-9729-0068-8

ГЛАВА 1

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ КВАЛИМЕТРИИ

1.1. БИОКВАЛИМЕТРИЯ КАК НАУКА

Современные успехи общей биологии и биотехнологии немыслимы без инновационной составляющей, которая во многом базируется на междисциплинарном плацдарме, позволяющем расширить методологические приемы науки. Одним из таких перспективных направлений является квалиметрия [лат. *qualis* - какой по качеству + гр. *metrio* - измеряю], которая изначально была создана как чисто техническая наука и заняла нишу на стыке стандартизации и метрологии. Однако позже объекты квалиметрического анализа были существенным образом расширены, а сегодня практически все области знания, где необходимо количественно оценить качество исследуемого объекта, используют достижения квалиметрии. Во многом универсальный характер квалиметрии обусловлен общенаучным понятием "качество", которое присуще объектам любого научного знания. Следует отметить, что квалиметрия как наука появилась совсем недавно. Основоположником данного научного направления является отечественный ученый Г.Г. Азгальдов, который в 1968 году вместе с коллективом единомышленников опубликовал статью, посвященную обоснованию создания новой науки - квалиметрии, указав на возможное использование квалиметрических подходов в биологии, а также в других фундаментальных науках (Азгальдов и др., 1968; Азгальдов и др., 2011).

С точки зрения общей биологии квалиметрия ставит своей целью на количественном уровне оценить качество объектов

живой природы, достигнув при этом единства измерений и необходимой сопоставимости результатов.

До сих пор экспериментальная деятельность по многим биологическим направлениям далека от инструментального воплощения, поэтому методические приемы во многом базируются на эвристической основе. Такое положение дел настоятельно диктует применение квалиметрии, позволяющей решить многие биологические проблемы. Очевидно, что экспертные оценки, которые сопутствуют исследованию любого уровня организации живой материи, необходимо подвергать квалиметрическому анализу. Без этой завершающей процедуры все остальные действия во многом являются недостоверными, так как основаны на субъективном подходе. Вместе с тем уже существуют примеры положительной кооперации двух наук.

Квалиметрия может быть востребована во многих биологических исследованиях, а именно:

1) в гистологии при оценке уравниности морфометрических параметров микроструктур различных тканей и органов (Киладзе, 2012);

2) в микробиологии при оценке степени обсемененности микроорганизмами;

3) в биохимии при оценке стабильности липидного компонента кожного покрова рыб (Киладзе, 2007);

4) при оценке степени биоповреждений различных техногенных объектов, испытывающих агрессивное воздействие биотических факторов внешней среды (например, морское обрастание твердых субстратов) (Ильин, 2008; Ковальчук и др., 2008);

5) в экологии при оценке степени встречаемости (обилия) различных видов животных и растений в экосистемах.

Велико значение квалиметрии и в прикладных аспектах биологии. Многие проблемы биологического материаловедения и товароведения животного и растительного сырья, где объектом изучения является сырье животного и растительно-го происхождения, могут быть эффективно решены с помощью квалиметрии (Киладзе, 2012).

Однако наиболее весомые результаты от внедрения квалиметрического подхода достигнуты в такой довольно узкой биологической дисциплине, как гистохимия ферментов. Полученные данные, основанные на квалиметрической интерпретации, удалось применить в таксономических реконструкциях, хемокommunikации, являющейся одним из фундамен-

тальных направлений этологии и зоопсихологии, а также в оценке половой, возрастной и сезонной изменчивости гистоэнзиматической активности кожных желез животных. Этот довольно локальный пример показывает ту познавательную широту, которой располагает квалиметрия как наука, ибо, являясь своеобразным "трамплином" в научном поиске, она позволила вскрыть новые взаимосвязи, необходимые для чисто биологического анализа.

Методические подходы квалиметрии, используемые для решения гистохимических проблем, сводятся к стандартным процедурам определения действительных и базовых значений показателей качества и их сопоставления, что позволяет выявить относительный уровень качества исследуемого объекта. В случае отсутствия базовых показателей качества нами был апробирован расчет коэффициента вариации, который отражает степень уравниности признака. Такой подход укладывается в квалиметрическую систему, поскольку естественная биологическим объектам, выступает как мера отклонения от среднего значения, имеющего в данном контексте смысл базового значения показателя качества (более подробно - см. раздел 2.2.).

Таким образом, преимущества использования квалиметрии налицо. Во-первых, эвристический результат, обработанный с помощью квалиметрического подхода, приобретает более строгую и формальную форму, а, во-вторых, становится возможным дальнейшая интерпретация полученных результатов в трактовке той науки, где была использована квалиметрия. В таком контексте квалиметрия приобретает признаки наддисциплинарной научно-исследовательской области, давая возможность практически любой науке добиться еще большего, чем она уже добилась с помощью собственного набора методов.

Полагаем, что в рамках содружества квалиметрии и биологии со временем возникнет новое научное направление - биоквалиметрия, которая будет решать не только узкие проблемы отдельных биологических наук, но и, в конечном счете, начнет оперировать всеми уровнями организации живой материи, начиная от молекулярного и заканчивая биосферным, создавая предпосылки к решению глобальных проблем человечества. Дефиницию предложенного научного направления можно определить следующим образом. Биоквалиметрия - это раздел квалиметрии, занимающийся количественной оценкой качества

организации живой материи на любом уровне, а также сырья животного или растительного происхождения. Очевидно, что в дальнейшем в рамках биоквалиметрии будут формироваться собственные разделы соответственно различным объектам исследования и применяемому методическому аппарату, адаптированному к конкретной проблеме, требующей квалиметрического решения. Так, объектно-предметное поле гистоэнзиматической квалиметрии как научной дисциплины представлено на рис. 1, из которого видно, что биоквалиметрия создает необходимый методический задел, а гистохимия ферментов предоставляет объекты для исследования.

Всё вместе формирует новую область знания, характеризующуюся определенным предметом исследования, требующим квалиметрической трансформации. Субъектами биоквалиметрии могут выступать как биологи разных специальностей (в нашем случае - гистохимики), так и представители технических наук, в том числе и квалиметрологи. В настоящее время биоквалиметрия только начинает очерчивать свою предметную область, однако учитывая, что атрибутивные характеристики свойственны любой биосистеме, перспективность данного направления становится очевидной. Во многом биоквалиметрия при выработке собственного методического инструментария может опираться на такое научное направление, как сенсорный анализ, или органолептика, в рамках которого разработаны подходы к формированию различных шкал и экспертных оценок.

Вместе с тем перед биологами встает такая ответственная задача, как ранжирование биологических свойств, что имеет существенное значение при определении коэффициентов весомостей исследуемого набора показателей. Эта процедура особенно важна при определении интегрального показателя качества, комплексно характеризующего биосистему. Определенную трудность представляет также разработка адекватного методического аппарата к квалиметрическому анализу биообъектов, что связано с естественной изменчивостью свойств (половой диморфизм, сезон, возраст, физиологическое состояние и др.), однако, как показывает практика, использование индексного подхода вполне решает поставленные задачи.

Считаем, что данное научное направление требует всемерной поддержки как со стороны научного сообщества, так и со стороны профильных министерств, заинтересованных в ин-

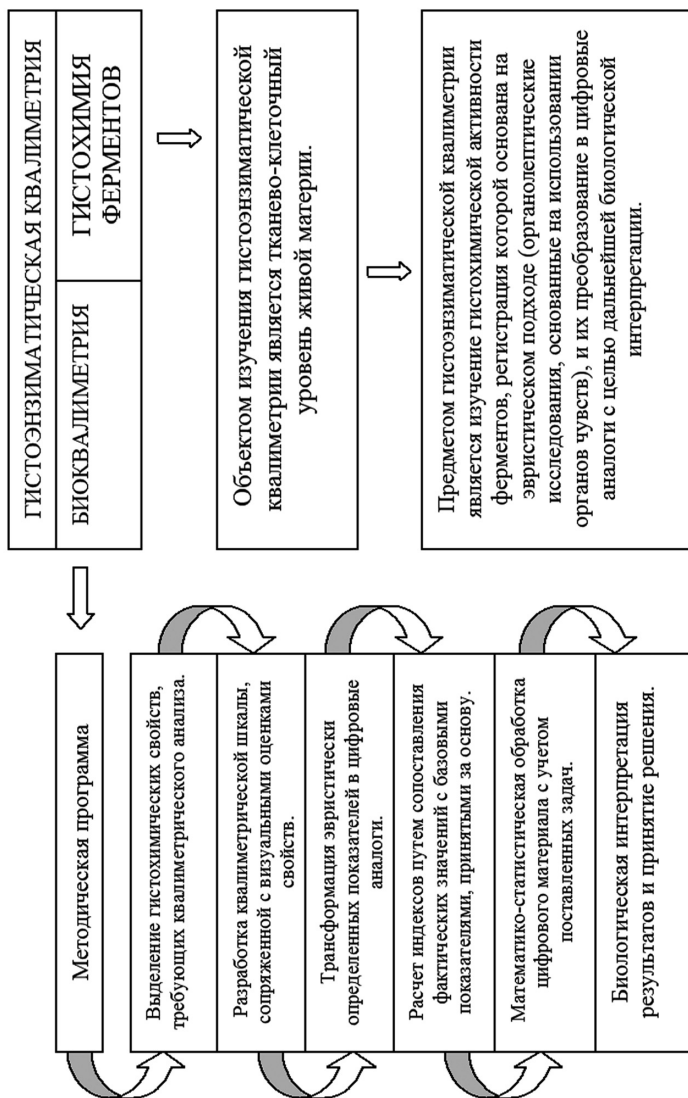


Рис. 1. Объектно-предметная и методическая база гистоэнзиматической квалиметрии

новационном развитии фундаментальных биологических доктрин (Киладзе, 2010, 2012).

1.2. КВАЛИМЕТРИЯ В ГИСТОХИМИИ ФЕРМЕНТОВ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Современная биологическая наука в настоящее время все больше вовлекает в свой инструментарий математические методы анализа, которые позволяют по-другому взглянуть на биологическую суть живой материи. Еще в 1901 году один из известнейших биологов-статистиков Карл Пирсон (1857–1936) вместе с антропологом Фрэнсисом Гальтоном (1822–1911) и зоологом Уэльдоном (1860–1906) основал научный журнал "Biometrika", в котором публиковали исследования по применению статистических методов в биологии такие ученые, как Рональд Фишер (1890–1962) и Уильям Госсет, более известный под псевдонимом Стьюдент (1876–1937) (Лакин, 1990). Из монографических работ следует указать на капитальный труд Д'Арси Томпсона "О росте и форме" (1917), на многие годы определивший интерес к методологическим проблемам использования математических оснований в биологической практике (Thompson, 2007).

Гистохимия, являясь частью морфологической науки о химических свойствах тканей, постепенно приобщается к математико-статистическому мировоззрению и подходит к осознанию эпистемологической пользы, которую может дать применение этой группы методов исследования.

Из гистохимии ферментов известно, что многие гистоэнзиматические показатели могут служить дополнительным критерием в комплексном таксономическом анализе форм (Джемухадзе, 2001). Вместе с тем на сегодняшний день практически отсутствуют данные статистической обработки таких показателей, что, естественно, ограничивает возможности их научной интерпретации (Берстон, 1965). Исследование гистохимических показателей тех или иных видов решает многие вопросы классической таксономии, носящие в настоящее время приоритетно-проблемный характер, формируя "точки роста" современной биологии. Побудительным мотивом к появлению данной работы как раз и послужила полемика на тему таксономической ценности гистохимических показателей в систематике,

хотя полезность этих интерьерных признаков не вызывает сомнения, так как они проявляют стойкую видоспецифичность, что подтверждено множеством публикаций. Однако использование полученных результатов в таксономической работе в виде стандартных обозначений было проблематично, корреляции сильно затушевывались, все обоснование строилось только на словесном описании, что было крайне неудобно и не давало возможности представить гистоэнзиматические данные с позиций систематики. Ведь только в новой трактовке гистохимические показатели можно рассматривать как фены. В настоящий момент появилась возможность воспользоваться всем накопленным инструментарием систематики, позволяющим обоснованно использовать данные гистохимии.

Ранее при построении графиков на основе различий в активности ферментов были введены цифровые обозначения степеней активности нескольких ферментов, названные условными единицами (Джемухадзе, Брауде, 1969). Для более обширных научных выводов необходимо дополнительное вовлечение в гистохимические исследования квалиметрических методов, уже отработанных при изучении липидного компонента кожного покрова рыб (Киладзе, 2007), а также на примере анализа шкур животных и кожевенного полуфабриката, используемого в кожевенной и меховой промышленности (Киладзе, 2004, 2005 а, б). Бытующие сегодня в гистохимии вариабельность обозначения активности ферментов и различия в количестве градаций степени гистоэнзиматической активности с точки зрения единства подходов к пониманию химических свойств ферментов нельзя признать эффективными. Вот почему постановка исследований, обращенных к унификации гистоэнзиматического анализа, характеризуется актуальностью и имеет весомое научное значение.

Современная квалиметрия как отрасль квалитологии [лат. *qualis* - какой по качеству + гр. *logia* - учение], то есть науки о качестве, располагает методологическими возможностями количественного анализа качественных состояний биосистем, что, по сути, можно рассматривать как биологическую трактовку квалиметрических методов (Азгальдов и др., 1968; Гиссин, 2000). Прикладная квалиметрия помогла биологам нащупать определенные пути решения проблемы адекватного представления результатов гистоэнзиматического анализа, сводящиеся к переходу от классического знакового к цифро-

вому выражению активности, обладающему рядом известных гносеологических преимуществ, формирующихся за счет полноценного использования статистического инструментария, позволяющего выявить множество скрытых на первый взгляд закономерностей, имеющих важное биологическое значение.

Квалиметрия дает возможность перейти на цифровое представление результатов, имея только качественную составляющую гистоэнзиматической активности, которую исследователь регистрирует визуально под микроскопом. Это своего рода экспертная оценка гистоэнзиматической активности. Если раньше экспертные оценки в области гистохимии ферментов регистрировали с помощью традиционных знаков "+" или "-", то сейчас сделана попытка отойти от этого, поскольку поиск средств подтверждения гипотезы о систематической роли гистоэнзиматических характеристик кожных желез ставит задачу реконструкции фенетического древа, позволяющего в какой-то мере интерпретировать филогенетическое родство. Очевидно, что с помощью знаков "+" или "-" это сделать проблематично, ибо реконструкция предполагает применение кластерного анализа, базирующегося на статистической информации. Именно в связи с этими посылами и возникла идея квалиметрического представления гистохимических результатов.

Суть работы, о которой рассказывается в данном разделе, сводится к переводу стандартных гистохимических обозначений активности ферментов в цифровые аналоги, которые позволяют более точно оценивать степень ферментной активности. Полученные на примере квалиметрического анализа гистоэнзиматических показателей кожных желез млекопитающих результаты доказывают наличие широких возможностей использования квалиметрического подхода к решению целого ряда биологических задач.

Определение градации (степени) гистоэнзиматической активности регистрируется органолептическим методом под микроскопом, что придает гистохимическому исследованию экспертный характер и говорит о качественном уровне полученного результата. В качестве основополагающей номенклатуры гистоэнзиматических показателей кожных желез можно предложить на рассмотрение ферментную активность КФ, ЩФ и АТФазы. Физиологическое значение этих фосфатаз известно и подробно изложено в фундаментальных сводках, посвященных гистохимии ферментов (Берстон, 1965). Необходимо от-

метить, что названные ферменты характеризуются неразрывной взаимной сопряженностью функциональной нагрузки в рамках одной клетки, обеспечивая ее жизнедеятельность.

Финальным этапом любого гистохимического исследования является регистрация реакции, при этом следует придерживаться той практики регистрации интенсивности реакции, которая сложилась для данной отрасли гистохимии (световая энзимология, электронная гистохимия, иммуногистохимия и т.д.). Подчеркивая актуальность этого методического подхода, приведем высказывание одного из известнейших гистохимиков Ханса Луппы (Hans Lippa), который писал: *"Выражаемая в относительных единицах интенсивность гистохимической реакции представляет собой более объективную оценку результатов опыта, чем простое наблюдение"* (Луппа, 1980).

В настоящее время гистохимия, преодолев чисто описательный алгоритм исследований, вошла полноправным членом в фундаментальные дисциплины, способные объяснять физиолого-биохимические процессы, происходящие на клеточно-тканевом уровне, а также внедряет гистохимические данные в зоологию, экологию, систематику и этологию. Вот почему проблема способа выражения качественной гистохимической реакции, регистрируемой на уровне светооптической микроскопии, выходит на первый план.

Полагаем, что необходимо провести не только унификацию и систематизацию для разработки единообразия выражения гистохимической реакции, но и установления оптимального числа градаций. Применяемый способ выражения должен быть понятен заинтересованным специалистам в разных областях биологии, то есть необходимо обеспечить "совместимость" гистохимии с другими биологическими науками.

Проблема унификации является первоочередной для гистохимиков, которые в силу специфики решаемых научных задач (в онкологии, зоологии, технологии и др.), базируясь во многом на эвристическом подходе, создали множество оригинальных способов выражения гистохимических реакций.

Например, оценку активности ЩФ лейкоцитов проводят для серии нейтрофилов из каждого мазка периферической крови, которым на основе интенсивности визуально наблюдаемого цитоплазматического продукта реакции (табл. 2) присваивают соответствующие баллы, варьирующие в пределах 0–4+ (0, 1+, 2+, 3+, 4+) (рис. 2).

Таблица 2

Степень осаднения азокрасителя в цитоплазме нейтрофила как полуколичественная оценка активности ЩФ (Tanaka et al., 1984; Alkaline Phosphatase, 2003)

Градация активности	Доля объема цитоплазмы, занимаемая осадком азокрасителя, %	Размер гранул	Интенсивность окрашивания	Цитоплазматический фон
0	Нет	-	Отсутствует	Отсутствует
1+	< 50	Мелкие	Слабая	От бесцветного до слабо бледно-розового или бледно-синего
2+	50-80	От мелких до средних	Умеренная	От бесцветного до бледно-розового или бледно-синего
3+	80-100	От средних до крупных	Сильная	От бесцветного до розового или синего
4+	100	От средних до крупных	Интенсивная	Не отображается

При этом оценка основана на том, что суммарная гистохимическая активность отражает активность ЩФ 100 нейтрофилов, которая может варьировать в пределах 0–400 баллов. Расчет ведут таким образом, что сначала перемножают количество нейтрофилов, попавших в ту или иную градацию активности фермента, на соответствующий балл, затем полученные произведения суммируют, получая обобщенную активность ЩФ для 100 нейтрофилов. На следующем этапе проводят суммирование повторений, после чего для нахождения средней активности полученную сумму баллов делят на количество повторений (Kaplow, 1955; Tamburlin, Glomski, 1988), то есть

$$\overline{\text{LAP}} = \frac{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n A_i K_i}{m},$$

где $\overline{\text{LAP}}$ – средняя суммарная активность ЩФ, характерная для 100 нейтрофилов для m -повторений ($m \geq 1, j = 1, \dots, m$); K_i – количество нейтрофилов, имеющих определенную градацию активности ЩФ ($n \geq 0, i = 1, \dots, n = 100$); A_i – градация активности ЩФ ($n \geq 0, i = 1, \dots, n = 4$).

Содержание

Предисловие	3
Введение	5
Глава 1	
ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	
ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ КВАЛИМЕТРИИ	12
1.1. Биоквалиметрия как наука	12
1.2. Квалиметрия в гистохимии ферментов: возможности и перспективы применения	17
Глава 2	
БИОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИФРОВЫХ АНАЛОГОВ	
ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ	30
2.1. Дескриптивная статистика цифровых аналогов гистоэнзиматической активности	31
2.2. Биоквалиметрическая оценка вариации цифровых аналогов гистоэнзиматической активности	39
2.3. Корреляционно-регрессионный анализ цифровых аналогов гистоэнзиматической активности	44
2.4. Дисперсионный анализ цифровых аналогов гистоэнзиматической активности	52
2.5. Ряды динамики цифровых аналогов гистоэнзиматической активности	57
Глава 3	
ПРАКТИКА ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ	
БИОКВАЛИМЕТРИИ И БИОМЕТРИИ	
В ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	65
3.1. Анализ гистоэнзиматической активности сальных желез копетдагской полевки	65
3.2. Корреляция активности некоторых фосфатаз в среднебрюшной железе и неспецифических сальных желез загрызка на примере хомячка Кэмпбелла	70

3.3. Динамика сезонной активности некоторых фосфатаз в неспецифических сальных железах загривка на примере джунгарского хомячка	74
3.4. Гистоэнзиматическая активность специфических кожных желез обыкновенного ежа в период зимней спячки	76
3.5. Возрастные особенности гистоэнзиматических характеристик кожных желез китайской полевки	80
3.6. Гистоэнзиматическая активность кожных желез в контексте биоинформатики	89
3.6.1. Многоуровневая модель хемокоммуникационных отношений двух видов полевок рода <i>Lasiopodomys</i> на основе гистоэнзиматической активности желез кожного покрова ..	89
3.6.2. Энтропия гистоэнзиматической активности в неспецифических сальных железах загривка хомячка Кэмпбелла в различные периоды половой активности	103
3.7. Систематическое положение восточноевропейской полевки по гистохимическим характеристикам кожных желез	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	110
Литература	112