

А. Б. МЕЛНИК-МУСЬЯН

К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА ГОМОРИ ДЛЯ ГИСТОХИМИЧЕСКОГО
ИЗУЧЕНИЯ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА

За последнее время гистохимические методы исследования все шире входят в нейрогистологию. Кроме изучения морфологической картины эти методы дают возможность определить химический состав тканей и протекающий в них обмен веществ.

Общезвестно какую важную роль в процессах метаболизма играют ферменты [1]. Поэтому изучение ферментативной активности в тканях приобретает особое значение. Известно также, что соединения фосфорной кислоты содержат в себе основную энергию, необходимую для физиологической деятельности клетки. Исходя из этого, изучение фосфорного обмена приобретает большой интерес.

По вопросу изучения активности фосфатаз в литературе имеется обширный материал, касающийся распределения как кислой, так и щелочной фосфатазы в различных органах и тканях. Исследования эти проведены как на человеке, так и на животных, причем изучалась активность кислой и щелочной фосфатазы не только в нормальных, но и в патологических условиях [3, 4].

Что касается органа зрения, то основные исследования в этом направлении относятся к щелочной фосфатазе, т. е. к местоположению фермента в тканях глаза. Исследования ряда авторов Аллена и Фриденвальда [15], Рейса [7, 8, 9], Линдемманна [10], Иосиды [12, 13, 14], Бехера и Эйхнера [11] и др. показали распределение щелочной фосфатазы в различных отделах органа зрения, начиная от эпителия конъюнктивы век, кончая сетчатой оболочкой и зрительным нервом.

Несмотря на достаточно широкое освещение состояния ферментативной активности щелочной фосфатазы в тканях глаза, изучению активности кислой фосфатазы посвящено сравнительно незначительное количество работ.

Нам интересовало состояние активности кислой фосфатазы сетчатки глаза у различных животных в норме. Определение кислой фосфатазы в сетчатке глаза биохимическим путем производилось по методу Боданского. Наши данные свидетельствуют о повышенном содержании кислой фосфатазы по сравнению со щелочной. Активность щелочной фосфатазы очень низка, кислой — 940—1125 гамма.

Кроме определения кислой фосфатазы биохимическим путем, мы исследовали сетчатку также и гистохимическим методом. Особого внимания заслуживает метод, предложенный для этой цели в 1941 г. Гомори [3].

Метод основан на следующем принципе: кислая фосфатаза является ферментом, который расщепляет моноэфиры фосфорной кислоты. В качестве моноэфиров в методе Гомори применяется глицерофосфат натрия. Находящийся в тканях фермент при pH — 4,7—5 расщепляет глицерофосфат, осаждая ионы фосфорной кислоты на месте действия фермента в виде фосфата свинца, который под действием сернистого аммония превращается в черный сернистый свинец. Такие «черноокрашенные» места и являются местом локализации активности фермента.

Чтобы избежать предварительной процедуры приготовления срезов (так как заливка в парафин и последующие условия обработки препарата снижают первоначальную активность энзима в ткани), мы прибегли к использованию плоскостных препаратов сетчатки. Исследовались сетчатка кролика, кошки, собаки, (8 глаз собаки, 17—кошки, 17—кролика). Животное забивалось, глаза брались сразу после его забоя. После энуклеации глаза, последний надрезался по экватору и фиксировался в 4% нейтральном формалине на холоду в течение одних суток. Суточная фиксация была вполне удовлетворительной. Ацетоновая фиксация вызывала быстрое обезвоживание ткани и ее сморщивание.

Через сутки глаз вынимался из формалина, разрезался по экватору, содержимое его удалялось, после чего отсепаровывалась сетчатка. Последняя разрезалась на четыре части и тщательно промывалась в дистиллированной воде в течение 10—15 мин. в нескольких ее сменах. Обработанная таким образом сетчатка погружалась в субстрат, который помещался в термостат при температуре 37°.

Субстрат готовился по прописи Вольфа, Кабата и Ньюмана [5]. Инкубация длилась от 2 ч. до суток. Такие сроки выдерживания препарата в субстратной смеси делались с целью полного выявления нервных элементов.

Уже через три часа обнаруживалась активность фермента. Полученные нами данные оказались одинаковыми при разных сроках инкубации у разных видов животных. Так, при инкубации через 3, 4, 5, 6, 7, 8 ч. и сутки картина получалась идентичной. При инкубации более суток «окрашенные» места обесцвечивались.

По нашим данным на плоскостных препаратах сетчатки кислая фосфатаза активна в слое нервных волокон, ганглиозных клеток и наружном зернистом слое. Четко вырисовываются волокна зрительного нерва на всем протяжении сетчатки от соска зрительного нерва до ога serrata (микрофото 1). Что же касается слоя ганглиозных клеток, то отмечается выраженное «окрашивание» ядра по сравнению с нейроплазмой клетки. В некоторых препаратах ядрышки ганглиозных клеток выявляются достаточно четко; местами же ядро настолько темно «окрашено», что ядрышки почти не видны. Нейроплазма четко выражена; виден осадок в виде зерен по периферии клетки и по ходу отростков (микрофото 2). Между ядром и нейроплазмой остается узкая неокрашенная каемка. Отростки, отходящие от ганглиозных клеток, отчетливо видны почти до самого своего конечного разветвления.



Макрофото 1



Микрофото 2

Средние и мелкие ганглиозные клетки импрегнируются сильнее, особенно ядра. Отростки от этих клеток почти не выявляются. Достаточно четко видны горизонтальные клетки и биполяры (микрофото 3). Полученная морфологическая картина была одинаковой во всей серии опытов, что свидетельствует о специфичности данной реакции.

Смит [6] показал, что при нагревании срезов до 80—100° до инкуба-

ции фермент инактивируется, окраска нервных структур исчезает. То же

самое получается, если из субстрата удалить глицерофосфат или пользоваться препаратами, которые фиксировались в формалине больше чем две недели. Наши опыты показали, что длительная формалиновая фиксация, также, как и температурная обработка тканей, вызывали сильное снижение активности фермента.

Опыты, проведенные А. М. Чилингаряном [2], показывают о некотором отличии между

ферментами ядер и нейронов. Очевидно, в связи с этим и следует объяснить разницу в окраске ядра и отростков ганглиозной клетки сетчатки. Таким образом, полученные данные говорят о следующем:

1. В сетчатке глаза наблюдается четко выраженная активность кислой фосфатазы.
2. Активность кислой фосфатазы обнаруживается уже через три часа после инкубации в субстратной среде.
3. Активность кислой фосфатазы в сетчатке глаза выше, чем актив-



Микрофото 3.

ность щелочной. Это доказывается ее определением биохимическим путем в наших опытах по методу Боданского.

4. На плоскостных препаратах кислая фосфатаза обнаруживается в следующих слоях: нервных волокон, ганглиозных клеток, наружном зернистом.

5. Содержание кислой фосфатазы, вероятно, имеет существенное значение для обмена веществ сетчатки.

Лаборатория биофизики анализаторов
Института физиологии им. акад. Л. А. Орбели
АН АрмССР

Поступило 5. XI 1959 г.

Ա. Բ. ՄԵԼՆԻՔ-ՄՈՍՅԱՆ

ԱՉՔԻ ՑԱՆՑԱՌՈՒՎԱԿԱՆՓԻ ՀԻՍՏՈՔԻՄԻԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԵՐՈՒԹՅԱՆ ՀԱՐԱՐ ՀՈՒՐՈՐԻՒ ՄԵԹՈԴԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ԱՌԹԻՎ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հեղինակը Հոմորիի մեխոլով, հիստոքիմիական ճանապարհով, ուսումնասիրել է թթվային ֆոսֆատազայի ակտիվության վիճակը կառվի, ճազարի ու շան աչքի նորմալ ցանցաթաղանթում և հանգել է հետևյալ եզրակացությանը.

1. Աչքի ցանցաթաղանթում նկատվում է ցայտուն տրասհայտված թթվային ֆոսֆատազայի ակտիվություն.

2. Թթվային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը սուրստրատային միջավայրում բացահայտվում է ինկուբացիայից արդեն 3 ժամ անց:

3. Աչքի ցանցաթաղանթում թթվային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը ավելի բարձր է, քան հիմքային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը, որ ապացուցվում է բիոքիմիական մեխոլով ըստ Բոդանսկու.

4. Ցանցաթաղանթի տոտալ պրեպարատներում թթվային ֆոսֆատազան հայտնաբերվում է հետևյալ շերտերում՝ ներթվային մանրտվիչների, դանդիոզային բջիջների, արտաքին հատիկային:

5. Թթվային ֆոսֆատազայի պարունակությունը, ըստ Հեղինակի ենթադրության, էական նշանակություն ունի ցանցաթաղանթի նյութափոխանակության համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Энгельгардт В. А. Фосфорная кислота и функции клетки. Известия АН СССР, серия биол. 2, 1945.
2. Чилингариан А. М. О свойстве кислой фосфатазы, локализованной в разных тканевых структурах. Доклады АН АрмССР, т. 23, 4, 1959.
3. Gomori G. Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. Arch. path. 32, 189—199, 1941.
4. Gomori G. Distribution of acid phosphatase in normal organs and tissues. J. cell Comp. physiol. 17, 71—83, 1941.

5. Wolf A., Kahat E., Newman W. Histochemical studies on tissue enzymes III. A study of the distribution of acid phosphatases with special reference to the nervous system. *Am. J. Pathol.* 19, 423—439, 1913.
6. Smith The reaction of formalin fixed tissues of the nervous system to the acid phosphatase method. *Anatomical Record* 1, 100 776—776, 1945.
7. Reis J. L. Histochemical localization of alkaline phosphatase in the retina. *Brit. J. Ophthalm.* 38, 1, 35—38, 1954.
8. Reis J. L. Histochemistry. In: *Mod. Trends Ophthalmology*, pp. 10—12. Third series. London, 1955.
9. Reis J. L. Phosphatase activity in the ocular tissues. *Brit. J. Ophthalm.* 35, 3, 149—152, 1951.
10. Lindenmeyer V. F. Alkaline and Acid Phosphatase Activity of the Embryonic chick Retina. *Proc. of the Society for exper. Biol. and Med.* Vol 71, number 3, July 1949.
11. H. Vosch and E. Scherer. Histochemical investigation of the human Retinae. *V. exh. anat. Ges.* 311—315, 1957.
12. Носидэ М. Распределение щелочной фосфатазы в сетчатке быка. *Japan. J. Physiol.* 7, 3, 195—198, 1957.
13. Носидэ М. Активность щелочной фосфатазы в изолированных ядрах бычьей сетчатки. *Japan. J. Physiol.* 7, 3, 190—191, 1957.
14. Носидэ М. *Japan. J. Physiol.* 8, 1, 31—40, 1958.
15. Allan R. A. and Frickewald J. S. Distribution of substrate-specific alkaline phosphatases in the ocular tissues. *Arch. Ophthalm.* v. 50, 6, 671—684, 1953.